NIKKOMYCIN, EIN NEUER HEMMSTOFF DER MIKROBIELLEN CHITINSYNTHESE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt
von
HELMUT HÖHNE
aus Halle/Saale

1974

75 56

NIKKOMYCIN, EIN NEUER HEMMSTOFF DER MIKROBIELLEN CHITINSYNTHESE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt

von

HELMUT HÖHNE

aus Halle/Saale

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Oktober 1974

Dekan	Professor Dr. F.-W. Bentrup
1. Berichterstatter	Professor Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter	Professor Dr. H. Diekmann

aku-Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas und die großzügige Förderung der Arbeit möchte ich Professor Dr. H. Zähner herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Professor Dr. H. Kern am Institut für Spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, für die Unterstützung bei den Pflanzenversuchen.

Für die Untersuchungen bei der chemischen Bearbeitung Nikkomycins und die gute Zusammenarbeit möchte ich Herrn Professor Dr. H. Hagenmaier und Frau U. Dähn vom Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Tübingen danken.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I und II, sowie des Instituts für Spezielle Botanik für die gute Zusammenarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0069

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
cpm	counts (Impulse) per minute
dpm	decays (Zerfälle) per minute
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule, Institut für Spezielle Botanik, Zürich
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
IR	infrarot
MHK	minimale Hemmkonzentration
TÜ	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

Für die Purin- und Pyrimidinnukleotide wurden die geläufigen Standardabkürzungen verwendet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	Einleitung	1
II	Material und Methoden	
	1. Chemikalien	4
	2. Nährmedien	5
	3. Versuchsorganismen	6
	4. Plattendiffusionstest	8
	5. Bestimmung des Streptomyzeten	9
	6. Herstellung des Antibiotikums	9
	7. Charakterisierung	11
	8. Wirkungsspektrum	12
	9. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uracil, Isoleucin und N-Acetyl-D-glucosamin in Zellen von Mucor hiemalis (+)	12
	10. Chitinsynthese in vitro	14
	11. Pflanzenversuche mit Nikkomycin	16
III	Ergebnisse	
	1. Beschreibung des Organismus	21
	2. Herstellung des Antibiotikums	21
	3. Charakterisierung	23
	4. Wirkungsspektrum	31
	5. Einfluß Nikkomycins auf die DNS-, RNS-, Protein- und Chitinsynthese in vivo	34
	6. Einfluß Nikkomycins auf die Chitinsynthese in vitro	40
	7. Pflanzenversuche mit Nikkomycin	43
IV	Diskussion	48
V	Zusammenfassung	64
VI	Literaturverzeichnis	65

I EINLEITUNG

Aus einer Bodenprobe von Nikko, Japan, wurde 1970 im Rahmen eines Antibiotika-Screenings ein Actinomycetales-Stamm (TÜ 901) isoliert, der ein Antibiotikum bildet, welches das Wachstum von Botrytis cinerea, Mucor hiemalis sowie einer Reihe anderer, zum Teil phytopathogener Pilze hemmt. Das Antibiotikum erhielt den Namen Nikkomycin.

Außer der Hemmung des Wachstums verursacht das Antibiotikum morphologische Veränderungen an den Hyphenspitzen der empfindlichen Pilze. Diese Veränderungen führen bei Mucor hiemalis und Botrytis cinerea zu keulenartigen oder protoplastenähnlichen Strukturen. Abbildung 1 zeigt in einer Mikrophotographie von Mucor hiemalis eine charakteristische Ausprägung dieser Mißbildungen.

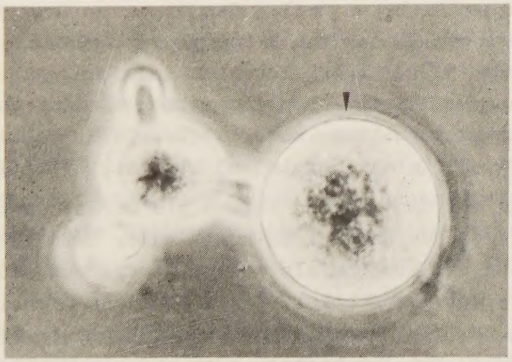


Abb. 1: Mucor hiemalis (+); ausgekeimte Spore (links) - eine Hyphe ist unter Nikkomycineinfluß protoplastenähnlich angeschwollen (Pfeil). Vergrößerung: 400 x.

Solche morphologischen Veränderungen sind in der Literatur bei anderen antifungischen Antibiotika unter der Bezeichnung "Keulenbildung" bzw. "bulging effect" beschrieben. So isolierten Links et al. (1957) aus Streptomyces sp. einen "bulging factor". Auch Filipin verursacht diese Mißbildung (Gottlieb et al., 1960). Ferner ist für die Antibiotika X-5079c = Saramycetin (Gale, 1963; Hütter et al., 1965), Cyanein (Betina et al., 1966), Polyoxin D (Endo et al., 1970), Bulgerin (Shoji et al., 1970), Ropalocidin (Mahl, 1971) und das Antibiotikum 24010 (Mizuno et al., 1971) der "bulging effect" beschrieben.

Die Ausbildung protoplastenähnlicher Strukturen bei Pilzen unter dem Einfluß eines Antibiotikums deutet in vielen Fällen auf eine Störung der Zellwandsynthese. Für Polyoxin D, einer Komponente aus der mindestens 12 Antibiotika umfassenden Polyoxingruppe (Isono et al., 1965, 1967, 1968), ist die Wirkungsweise bekannt. Bei den bisher untersuchten Pilzen hemmt es den Einbau von N-Acetyl-D-glucosamin in Chitin (Endo et al., 1970). Dabei beruht die Hemmung auf einem zu Uridindiphospho-N-acetyl-D-glucosamin kompetitiven Angriff auf die Chitinsynthetase (Endo et al., 1970; Keller und Cabib, 1971; Bartnicki-Garcia und Lippman, 1972; Jan, 1974).

Chitin kann bei den meisten Pilzen als Gerüstsubstanz der Zellwand angesehen werden. Es kommt außer bei Pilzen noch bei Insekten und Krebsen als wesentlicher Bestandteil des Exoskeletts vor. Es scheint, daß alle diese Organismen für ihr Chitin den gleichen Biosyntheseweg besitzen (McMurrough et al., 1971). Von Antibiotika oder anderen Verbindungen, die in die Biosynthese von Chitin eingreifen, sollte man von der Wirkungsweise her keine toxische Wirkung gegen Organismen erwarten, die über keine dem Chitin ähnliche Strukturen verfügen. Solche Antibiotika wären zur Bekämpfung der Chitin synthetisierenden Organismen geeignet. Dazu könnte

zusätzlich ihre molekulare Grundstruktur modifiziert werden, um einzelne Derivate mit hoher Selektivität für spezielle mögliche Einsatzgebiete zu realisieren. Einmal wären sie in der Landwirtschaft und im Gartenbau als Fungizide und/ oder Insektizide anwendbar. Auf der anderen Seite könnten solche Antibiotika oder ihre Derivate als Chemotherapeutika in der Human- und Tiermedizin eingesetzt werden.

Die Polyoxine können für das Suchen und Auffinden sowie für die Bearbeitung neuer Antibiotika mit den genannten selektiven Wirkmechanismen als Modellsubstanzen angesehen werden. Ihre Wirkungsweise hat sie zunächst als Pflanzenschutzmittel gegen Piricularia oryzae bekannt werden lassen (Isono et al., 1965).
Die Herstellung semisynthetischer Polyoxinderivate wurde vorläufig erst zur Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehung unternommen (Isono et al., 1971). Mit der Herstellung von 5-Fluorpolyoxinen (Verfütterung von 5-Fluoruracil bei der Fermentation des Polyoxine produzierenden Streptomyces cacaoi) haben Isono et al. (1973) jedenfalls begonnen, durch Modifikation des Polyoxingerüstes ein verändertes Wirkungsspektrum zu erhalten. Sie fanden zwei abweichende Polyoxinkomponenten, 5-Fluoruracilpolyoxin L und 5-Fluoruracilpolyoxin C, die allerdings aufgrund eines neuen Wirkmechanismus antibiotische Aktivität gegen Bakterien besitzen. Sie hemmen außerordentlich stark das Wachstum von Escherichia coli und Streptococcus faecalis (10^{-5}-10^{-6} M).

Aufgabe dieser Arbeit ist die Beschreibung der biologischen Aspekte von Nikkomycin. Die chemische Bearbeitung liegt in den Händen von Professor Dr. H. Hagenmaier und U. Dähn am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Tübingen.

II MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Sofern nicht besonders angeführt, wurden Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet.

1.1. Chemikalien für Nährmedien

von Brenntag, Mühlheim/Ruhr
- Niax Polyol, LHT 67

von Ciba-Geigy, Basel
- Sequestrene

von Deutsche Maizenawerke, Hamburg
- D-Glucose
- Mannit

von Difco Laboratories, Mich., USA
- Bacto-Agar
- Bacto-Malt Extract
- Bacto-Peptone Iron Agar
- Bacto-Yeast Extract

von Oxoid Ltd., London, England
- Potato-Dextrose Agar

von W. Schoenenberger, Magstadt bei Stuttgart
- Sojabohnenmehl

1.2. Chemikalien zur Aufarbeitung und Charakterisierung

von Calbiochem, Los Angeles, Cal., USA
- Bio-Gel P 2 (50-100 mesh)

von Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
- Dowex 50 WX 4 (50-100 mesh)
- Tween 80

von Johns, Manville, Cal., USA
- Hyflo Super-Cel (Celit)

1.3. Radiochemikalien

von The Radiochemical Centre, Amersham, England

N-(Acetyl-^{3}H)-D-glucosamin	680 mCi/mmol
L-isoLeucin-^{14}C(U)	10 mCi/mmol
Thymidin-2-^{14}C	60 mCi/mmol
Uracil-2-^{14}C	50 mCi/mmol
Uridindiphospho-N-acetyl-D-glucosamin-^{14}C(U)	269 mCi/mmol

1.4. Antibiotika

von Calbiochem, Los Angeles, Cal., USA
Oxytetracyclin
von The Upjohn Company, Kalamazoo, Mich., USA
Cycloheximid (Acti-dion)

1.5. Substanzen für die in vitro Versuche zur Chitinsynthese

von Boehringer, Mannheim
Adenosintriphosphorsäure
Uridindiphospho-N-acetyl-D-glucosamin

2. Nährmedien

2.1. Komplexmedium für Pilze und Streptomyzeten nach Müller (1968)

Hefeextrakt 4g; Malzextrakt 10g; D-Glucose 4g; Agar 20g; Leitungswasser 1 l.

2.2. Komplexmedium für Botrytis cinerea nach Hütter et al. (1965)

Malzextrakt 20g; Agar 17g; Leitungswasser 1l.

2.3. Komplexmedium für Oomyzeten (von Oxoid)

Kartoffelextrakt 4g; D-Glucose 20g; Agar 15g; Leitungswasser 1l.

2.4. Synthetisches Medium für Pilze und Streptomyzeten nach Hütter et al. (1966)

D-Glucose 8g; Ammontartrat 4g; NaCl 5g; K_2HPO_4 2g; $MgSO_4$ x 7 H_2O 1g; $CaCl_2$ 200mg; $MnSO_4$ x 7 H_2O 10mg; Ferrioxamin 20mg; Agar 15g; H_2O (entmin.) 1l.

2.5. Komplexmedium für Bakterien nach Corbaz et al. (1957)

Fleischextrakt 3g; Pepton 5g; NaCl 2g; Agar 15g; Leitungswasser 1l.

Wurden Nährlösungen benötigt, entfiel der Zusatz von Agar. Alle Medien wurden bei 120°C 20 Minuten autoklaviert, die 10 Liter des Fermentationsansatzes bei 134°C 30 Minuten.

3. Versuchsorganismen

3.1. Bakterien

Bacillus subtilis Cohn ETH 2016 - TÜ 203
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers TÜ 201
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Henrici ETH 23575 - TÜ 57 +

3.2. Pilze

Aphanomyces stellatus de Bary CBS 578.67 +
Aspergillus fumigatus Fresenius ETH M 3636 - TÜ 149 +++
Basidiobolus microsporus Benjamin CBS 130.62 - TÜ 174
Botrytis cinerea Pers. ex Fr. TÜ 157 ++
Candida albicans (Robin) Berkhout TÜ 565
Cercospora beticola Sacc. CBS 152.52
Colletotrichum trifolii Bain. u. Essary CBS 149.34
Eremothecium ashbyi Guilliermond TÜ 173
Fusarium larvarum Fuckel TÜ 257
Fusarium oxysporum lycopersici ETH M 811 c
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart et Grigoraki TÜ 282
Mortierella isabellina var. vinacea TÜ 632
Mucor hiemalis Wehmer (+) TÜ 179 +
Mucor hiemalis Wehmer (-) TÜ 180 +
Phycomyces blakesleeanus Burgeff (+) CBS 283.35 - TÜ 183 +
Phycomyces blakesleeanus Burgeff (-) CBS 284.35 - TÜ 184 +
Phytophthora infestans CBS 368.51 +
Pythium debaryanum Hesse CBS 114.19
Rhizopus circinans v. Tieghem (+) CBS 319.35 ++
Rhizopus circinans v. Tieghem (-) CBS 320.35 ++
Rhizoctonia solani Kühn var. hortensis Schultz CBS 325.47
Saccharomyces cerevisiae Hansen TÜ 125
Saprolegnia asterophora de Bary CBS 180.44 +
Sapromyces elongatus (Cornu) Thaxter CBS 337.39 +
Sclerotinia fructicola (Wint.) Rehm CBS 329.35
Thielaviopsis basicola (Berk. u. Br.) Ferraris CBS 413.52
Ustilago maydis (Beckmann) Unger TÜ 567

Inkubationstemperaturen

Bakterien	37°C
	+ 27°C

Pilze	27°C
	+ 20°C
	++ 24°C
	+++ 37°C

4. Plattendiffusionstest

4.1. Testplatten

4.1.1. Mit Mucor hiemalis (+/-)

Die Herstellung der Sporensuspension sowie der Testplatten erfolgte wie bei Kirst (1971) bzw. Kneifel et al. (1974).

4.1.2. Mit Botrytis cinerea

Die Bereitung der Testplatten ist durch Hütter et al. (1965) beschrieben.

4.2. Platten zum Wirkungsspektrum

4.2.1. Mit sporulierenden Pilzen

Die Testanordnung war für die Zygomycetes die gleiche wie bei Kirst (1971). Mit den anderen Pilzen wurde ähnlich verfahren; bei ihnen wurde die Hemmung des Myzelwachstums gemessen, bei Mucor hiemalis jedoch nur die Hemmzonen der Zygosporenbildung registriert.

4.2.2. Mit Pilzen, die nicht oder nur schlecht sporulieren

Nach der Methode von Hütter et al. (1965) wurden die Platten verwendet. Eine eventuelle Wachstumshemmung konnte nach eintägiger Inkubation bei Botrytis cinerea abgelesen und registriert werden. Bei anderen Pilzen mußten wegen unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeiten andere Inkubationszeiten eingehalten werden.

4.2.3. Mit Saccharomyces cerevisiae, Candida albicans und Eremothecium ashbyi

Von den Organismen wurden Schüttelkulturen in Komplexmedium angesetzt, daraus je 1 ml (nach Inkubation über Nacht) entnommen, zu 100 ml auf 40°C abgekühlten Hefeagar gegeben und 17,5 ml-Portionen in sterile Petrischalen gegossen.

4.2.4. Mit Bakterien

Die Testanordnung war die gleiche wie bei Poralla (1967).

5. Bestimmung des Streptomyzeten

Die Bestimmung des Streptomyzeten TÜ 901 erfolgte nach dem Schlüssel von Hütter (1967). Dazu mußten morphologische Kriterien wie Sporenoberfläche, Sporenfarbe und Aussehen des Luftmyzels bzw. der Sporenketten untersucht werden. Als physiologisches Merkmal wurde die Melaninbildung auf Eisen-Pepton-Agar beurteilt. Die elektronenmikroskopischen Bilder der Sporen (zur Untersuchung der Sporenoberfläche) wurden im Max Planck Institut für Virusforschung, Tübingen, aufgenommen - hierfür sei an dieser Stelle gedankt.

6. Herstellung des Antibiotikums

6.1. Fermentation

Nach einer Reihe von Versuchen zur optimalen Nikkomycinproduktion (Höhne, 1972), wurden folgende Züchtungsbedingungen für die Fermentation im 10 l-Maßstab gefunden:

Fermenter	Modell E-14, Fa. New Brunswick Scientific Co., Inc., New Brunswick, New Jersey, USA
Nährlösung	2% Sojamehl, 2% Mannit, pH 7,5
Temperatur	27°C
Impfmenge	5%
Belüftung	2 l Luft/Minute
Rührer	250 Umdrehungen/Minute
Antischaum	50% äthanolische Polyollösung (wenige Tropfen)
Dauer	4-5 Tage

6.2. Aufarbeitung

Das Kulturfiltrat wurde nach Zugabe von 2% Celit am 4. oder 5. Tag der Fermentation mit einer Filterpresse abgepreßt und mit 2% Aktivkohle bei pH 6 eine Stunde gerührt, danach filtriert. Der Durchlauf wie das Myzel enthielt keine nennenswerte Aktivität; sie wurden beide verworfen. Die Elution des Antibiotikums erfolgte nach Waschen der Kohle mit entionisiertem Wasser mehrmals mit einer Mischung von 80% Aceton und 20% 0,5 N Ameisensäure. Die Eluate wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer in vacuo auf ein sehr kleines Volumen eingeengt. Das Konzentrat wurde mit entionisiertem Wasser versetzt und die Lösung erneut eingeengt. Dies geschah mehrfach, bis die Ameisensäure aus der Lösung entfernt war. Adaequate Mengen dieses Konzentrats wurden auf eine Säule (10x60 cm) mit Dowex 50 WX 4 aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit entmineralisiertem Wasser konnte das Antibiotikum mit Triäthylammoniumacetat-Puffer (0,5 N; pH 5,8) eluiert werden. Das Antibiotikum wurde erneut einem Reinigungsgang mit Aktivkohle unterzogen und schließlich durch Chromatographie an Bio-Gel P 2 (Säule 3x160 cm) gereinigt. Dabei konnte das Antibiotikum im Eluat mittels eines Durchflußphotometers mit Filter 280 nm re-

gistriert werden (LKB, Bromma, Schweden). Die aktiven Fraktionen (die Hemmhöfe über 35 mm im Plattendiffusionstest ergaben) wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingeengt und schließlich lyophilisiert. Eine weitere Reinigungsmöglichkeit bestand in der Rechromatographie an Bio-Gel P 2.

7. Charakterisierung

7.1. Stabilitätstest

Es wurden Pufferlösungen von pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 hergestellt und von dem Antibiotikum soviel eingewogen, daß jede Lösung 0,1 mg/ml enthielt. Die verschiedenen Lösungen wurden in zwei Ansätzen, einmal bei 4°C und einmal bei 20°C aufbewahrt und zwei Wochen lang täglich auf ihre antibiotischen Aktivitäten getestet.

7.2. Dünnschicht- und Papierchromatographie

Verwendet wurden Alufolien Kieselgel mit Schichtdicke 0,25 mm der Fa. Merck, Darmstadt, sowie Papierstreifen (212, Macherey, Nagel und Co., Düren). Die Lokalisierung der aktiven Substanz geschah einmal durch den chemischen Nachweis mit Ninhydrin-Sprühreagens, zum anderen mit der Bioautographie.

7.3. Papierelektrophorese

Es wurden Papierstreifen (wie oben) von 3 cm Breite und 10 cm Länge geschnitten und eine Niederspannungselektrophorese (140 V; 1 Stunde) mit einer einfachen Trenn-

kammer der Fa. Serva Biochemica, Heidelberg, durchgeführt. Zur Lokalisierung der Substanz wurden die Papierstreifen der Länge nach halbiert und zum einen mit Ninhydrin behandelt, zum anderen der Bioautographie unterworfen.

8. Wirkungsspektrum

Um einen Überblick über die Wirkungsbreite von Nikkomycin, und Hinweise auf seine minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) zu bekommen, wurden verschiedene Pilze dem Plattendiffusionstest unterzogen und dabei unterschiedliche Konzentrationen des Antibiotikums eingesetzt.

9. Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, Uracil, Isoleucin und N-Acetyl-D-glucosamin in Zellen von Mucor hiemalis (+)

Erlenmeyerkolben (50 ml; 1 seitl. Einstich; 10 ml synthetische Nährlösung) wurden mit Sporen von Mucor hiemalis (+) beimpft (Endtiter ca. 10^6 Sporen/ml) und 10 Stunden auf einer rotierenden Schüttelmaschine bei 20°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der radioaktiven Vorstufen der jeweils zu untersuchenden Makromolekülsynthese (Zeitpunkt 0 = Versuchsbeginn). Die Kolben enthielten außerdem 50 µg Oxytetracyclin pro ml.

Zur Prüfung der DNS-Synthese wurde der Vorkultur ^{14}C-Thymidin zugegeben: 10µg (2,5 µCi).

Die RNS-Synthese wurde mit Hilfe von ^{14}C-Uracil untersucht. Zu der Vorkultur kamen 4,7 µg (2,5 µCi) markiertes sowie 47 µg unmarkiertes Uracil.

Die Proteinsynthese konnte mit ^{14}C-Isoleucin kontrolliert werden: Zugabe 33 µg (2,5 µCi).

Der Einbau von ^{3}H-N-Acetyl-D-glucosamin sollte auf die Chitinsynthese schließen lassen. 6,5 µg (20 µCi) der markierten und 650 µg der unmarkierten Vorstufe wurden eingesetzt.

Die Durchführung der Versuche zur DNS-, RNS- und Proteinsynthese erfolgte nach Siddhikol et al. (1969), verändert nach Wolf (1971).

30 Minuten nach Zugabe der radioaktiven Vorstufen wurden bei allen Versuchen (3 Kolben pro Ansatz) die zu prüfenden Antibiotika zugesetzt. Neben Nikkomycin (Endkonzentration 0,5 µg/ml) wurde Cycloheximid (10 µg/ml) verwendet. Dazu blieb ein Kolben je Versuchsansatz zur Kontrolle ohne Antibiotikum. Zu den angegebenen Zeiten wurden aus allen Kolben 0,5 ml der Kultur entnommen und für die Prüfung der DNS-, RNS- und Proteinsynthese wie folgt behandelt. Die einzelnen Proben wurden in 0,5 ml eiskalte Trichloressigsäure (7%) pipettiert und die Ausfällung auf Membranfiltern (SM 11306, Porenweite 0,45 µ, 25 mm Ø, Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen) durch Absaugen erhalten.
Die zur Prüfung der Chitinsynthese entnommenen 0,5 ml Proben kamen in 0,5 ml 5% KOH. Diese Suspensionen wurden 4 Stunden in einem Wasserbad von 95°C erhitzt und anschliessend durch Membranfilter gesaugt. Der Niederschlag auf den Filtern wurde zunächst mit 2% Essigsäure, dann mit entionisiertem Wasser gewaschen. Diese Methode (nach Fuller und Barshad, 1960) erlaubt es, lediglich aus Cellulose und Chitin bestehendes Zellwandmaterial zu erhalten.
Die an der Luft getrockneten Membranfilter wurden mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (4 g Diphenyloxazol auf 1 l Toluol) versetzt. In einem Szintillationsspektrometer (Mark II, Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., USA) konnte die Radioaktivität des jeweiligen Niederschlags gemessen werden.

10. Chitinsynthese in vitro

Die Chitinsynthese wurde bereits bei anderen Pilzen, Krebsen und Insekten untersucht (Glaser und Brown, 1957; Jaworski et al, 1965; Porter und Jaworski, 1965, 1966; Camargo et al., 1967; Endo und Misato, 1969; McMurrough et al., 1971; McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971; Keller und Cabib, 1971; Jan, 1974). In allen Fällen war Uridindiphospho-N-acetyl-D-glucosamin (UDP-GlcNAc) das Substrat der Chitinsynthetase (Chitin : Acetyl-aminodeoxy-glucosyltransferase, EC 2.4.1.16). Die erwähnten Autoren verwendeten mitochondriale und ribosomale Enzympräparationen der untersuchten Organismen. McMurrough et al. (1971) und McMurrough und Bartnicki-Garcia (1971) fanden, daß Zellwandpräparationen von Mucor rouxii 85% der Chitinsynthetaseaktivität der Gesamtaktivität enthalten. Sie stellten weiter fest, daß das Enzym fest an die Zellwandstrukturen gebunden ist. Sie vermuten, daß das ebenfalls signifikante Aktivität aufweisende Enzym der mikrosomalen Zellpräparation ein Enzym im "statu nascendi" sein könnte, das noch nicht mit der Zellwand verknüpft wurde.

Folgender Versuch wurde teilweise nach Bartnicki-Garcia und Lippman (1972) durchgeführt.

10.1. Bereitung der partikulären Chitinsynthetasesuspension

Ein 500 ml Erlenmeyerkolben (1 seitl. Einstich) mit 100 ml synthetischer Nährlösung wurde mit Sporen von Mucor hiemalis (+) beimpft (Endtiter ca. 10^6) und 14 Stunden bei 20°C auf einer rotierenden Schüttelmaschine inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Abnutschen auf einer Glasfritte gewonnen und mit 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer, pH 6,5 gewaschen, der zusätzlich 10 mM $MgCl_2$ ent-

hielt. Die Suspension wurde nun bei 2000 g 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen des Zentrifugats wurden durch Einfrieren und Auftauen zerstört (McMurrough et al., 1971), mit eiskaltem 25 mM KH_2PO_4-KOH-Puffer (pH 6,5), der 5 mM $MgCl_2$ enthielt, versetzt und anschließend unter Kühlung mit einem Potter-Stempel homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand verworfen. Die Zelltrümmer wurden noch einmal der Homogenisation und Zentrifugation unterzogen und schließlich in 10 ml des 25 mM KH_2PO_4-KOH-Puffers (pH 6,5; 5 mM $MgCl_2$) suspendiert. Diese partikuläre Chitinsynthetasesuspension wurde in dem folgenden Versuch eingesetzt.

10.2. Enzymatischer Test

Ein Versuchsansatz enthielt in 25 mM KH_2PO_4-KOH-Puffer (pH 6,5; 5 mM $MgCl_2$) 20 mM N-Acetyl-D-glucosamin und 0,4 mM ATP. UDP-^{14}C-N-acetyl-D-glucosamin und Nikkomycin wurden, wie im Ergebnisteil beschrieben, zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 ml der partikulären Chitinsynthetasesuspension bei 20°C gestartet. Das Volumen eines Versuchsansatzes betrug 0,5 ml.
McMurrough und Bartnicki-Garcia haben 1971 gefunden, daß freies N-Acetyl-D-glucosamin die Chitinsynthetase aus Mucor hiemalis spezifisch aktiviert und die Aktivierung als allosterischer Effekt angesehen werden kann. Diese Tatsache wurde wie bei Bartnicki-Garcia und Lippman (1972) berücksichtigt. Die Zugabe von ATP stützt sich nach McMurrough und Bartnicki-Garcia (1971) auf die Erkenntnis, daß ATP eine bisher nicht aufgeklärte Rolle bei der Chitinsynthese spielt. Sie nehmen an, daß mit Hilfe von ATP die Umformung von UDP in UTP erfolgt. UDP, das bei der Chitinsynthese aus UDP-N-acetyl-D-glucosamin freigesetzt wird,

ist ein Inhibitor der Chitinsynthese.
Durch Zugabe von 0,2 ml 10% Trichloressigsäure konnte die Reaktion gestoppt werden. Der entstandene Niederschlag wurde durch Abnutschen auf einem Membranfilter (Porenweite 0,45 µ, 25 mm Ø) gewonnen, mit 0,2 N NaOH gewaschen und anschließend seine Radioaktivität (s. II.9.) bestimmt.

11. Pflanzenversuche mit Nikkomycin

Die verwendeten Pflanzen stammten alle aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich.

11.1. Prüfung auf Phytotoxizität

11.1.1. Keimungstest mit verschiedenen Getreidesamen nach Luke und Wheeler (1955), Pringle und Braun (1957) und Scheffer und Ullstrap (1965)

Verwendet wurden: Winter-Weizen, Sorte "Harvest Queen"; Winter-Gerste, Sorte "Nymphe"; Sommer-Roggen, Sorte "Beka"; Hafer, Sorte "Condor"; Reis, Sorte "Caloro".
Die Samenkörner wurden mit Leitungswasser 30 Minuten gewaschen, danach in einer Feuchtschale bei 21°C im Dunkeln 24 Stunden (Reis 48) inkubiert und anschließend (die Samen hatten 1-2 mm lange Wurzeln) mit dem Antibiotikum in Berührung gebracht. Eine Verdünnungsreihe wurde angesetzt (0,5; 0,1; 0,05 mg/ml Aqua dest.) und in sterile Petrischalen mit Filterpapiereinsatz von den Lösungen jeweils 5 ml pipettiert. Dazu kamen pro Versuchsansatz Kontrollpetrischalen, die nur destilliertes Wasser enthielten.

Die Petrischalen (jede enthielt 20 vorgekeimte Sämlinge) wurden ebenfalls bei 21°C im Dunkeln 24 Stunden (Reis 48) inkubiert. Zur Auswertung wurde pro Sämling die längste Wurzel gemessen.

11.1.2. Versuche mit ebenerdig abgeschnittenen Tomatenpflanzen

Verwendet wurden Tomatenpflanzen der Sorte "Tuckswood", ca. 3 Wochen alt, im 4-Blattstadium; von annähernd gleicher Größe und gleichem Gewicht. Die Bedingungen im Kulturraum: 8 Stunden 15°C, 16 Stunden 22°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% und Kunstlicht (16 Stunden). Nach dem Abschneiden wurden die Tomatensprosse in Gläschen mit 2 ml nach Ruffner (1974) modifizierter Knop-Lösung gestellt: $Ca(NO_3)_2$ 1g; KCl 0,25g; $MgSO_4$ 0,25g; KH_2PO_4 0,25g; Sequestrene^R 1mg; Hoagland-Lösung A-Z (Hoagland und Snyder, 1933) 1ml ad 1 l Aqua dest.
Um die traumatische Störung der Pflanzen durch das Abschneiden auszugleichen (Gäumann und Jaag, 1947), wurden die Tomatensprosse 24 Stunden in dieser Nährlösung belassen. Danach kamen sie in 2 ml Nährlösung, die verschiedene Konzentrationen des Antibiotikums enthielt (0,5; 0,25; 0,05 mg/ml). Bei dieser Umsetzung wird nach Gäumann und Jaag (1947) keine weitere Störung des Wasserumsatzes ausgelöst. Pro Konzentration wurden 10 Sprosse eingesetzt; ebenso für die Kontrolle. Die Pflanzen wurden 6 Tage in den Lösungen belassen; die Lösungen dabei nach 3 Tagen erneuert.

11.2. Versuche zur Aufnahme und zum Transport in Tomatenpflanzen

Zur Bestimmung des Antibiotikumgehaltes in den Pflanzen wurde in diesen Versuchen folgende Aufarbeitung der Pflanzen durchgeführt: Von den Pflanzen oder Pflanzenteilen eines Versuchsansatzes wurde zusammen das Frischgewicht bestimmt; nach dem Lyophilisieren das Trockengewicht. Nach dem Zerkleinern der getrockneten Pflanzen mit einem Homogenisator von der Fa. Braun, Melsungen (beschrieben bei Merkenschlager et al., 1957) - Glasperlengröße ca. 1 mm - wurde dem Pflanzenpulver das entzogene Wasser wieder zugesetzt. Der entstandene Brei wurde 15 Minuten stehengelassen und der Saft durch Abnutschen gewonnen. Mit Hilfe des Plattendiffusionstests konnte die Konzentration des Antibiotikums in der Pflanze bestimmt werden. Sie wurde angegeben in µg/g Frischgewicht der Tomatenpflanze. Zur Kontrolle des Tests wurde eine definierte Menge getrocknetes Pflanzenmaterial mit verschiedenen Mengen des Antibiotikums vermischt und ebenfalls der Aufarbeitung unterzogen. Das Antibiotikum konnte quantitativ im Pflanzensaft nachgewiesen werden. Somit veränderte weder der Pflanzensaft die antibiotische Aktivität von Nikkomycin, noch gingen davon durch die Aufarbeitung nennenswerte Mengen verloren.

11.2.1. Konzentrationsbedingte Aufnahme

Die Versuche wurden zum Teil nach Pramer (1954) durchgeführt. Abgeschnittene Tomatenpflanzen wurden ca. 5 Tage zum Wurzelziehen in Leitungswasser gestellt und danach dem Test ausgesetzt. Die Pflanzen kamen in Gläschen mit 2 ml Nährlösung, die zusätzlich verschiedene Nikkomycinkonzentrationen enthielten: 0,5; 0,25; 0,1 und 0,05 mg/ml.

Für jede Konzentration standen 10 Gläschen und 10 Pflanzen bereit. Die Pflanzen blieben 24 Stunden in den Lösungen. Danach erfolgte die Aufarbeitung zur Bestimmung ihres Antibiotikumgehaltes.

11.2.2. Verteilung des Antibiotikums in der Pflanze

Bewurzelte Pflanzen (wie oben) standen 48 Stunden in einer Nikkomycinlösung, die anfänglich eine Konzentration von 0,25 mg/ml besaß. Nach 14, 18, 22 und 48 Stunden wurden jeweils 5 Pflanzen entnommen, in drei Teile zerlegt und die vereinigten gleichen Teile zusammen aufgearbeitet. Die Teilung geschah folgendermaßen: Die Pflanzen wurden genau oberhalb der Keimblätter und oberhalb des zweiten Primärblattes zerschnitten. So erhielt man für jede Pflanze drei Teile, die folgend als unterer, mittlerer und oberer Teil benannt werden. Damit fand die Teilung der Pflanzen in Anlehnung an Pramer (1954) statt. Dort wurde der Wurzelteil verworfen; hier sorgfältig gewaschen und aufgearbeitet.

11.2.3. Verteilung des Antibiotikums in der Pflanze nach Zufuhrstopp

Bewurzelte Tomatenpflanzen wurden, nachdem sie 48 Stunden in einer Nikkomycinlösung von 0,25 mg/ml gestanden hatten, in Nährlösung überführt. Nach 24, 45, 66 und 96 Stunden wurden jeweils 5 Pflanzen entnommen, wie oben geteilt und aufgearbeitet.

11.2.4. Aufnahme des Antibiotikums durch das Blatt

Verwendet wurden Tomatenpflanzen in Töpfen - sie waren im 7-8-Blattstadium. Versuchen von Gray (1958) folgend, wurden

vom 4. oder 5. Blatt das endständige Teilblättchen in eine Nikkomycinlösung getaucht (0,25 mg/ml) und dort eine Woche gelassen. Damit das Blättchen immer benetzt war, mußte verdunstetes Wasser oder aufgenommene Lösung durch tägliche Wasserzugabe ersetzt werden.

III ERGEBNISSE

1. Beschreibung des Organismus

Der Stamm TÜ 901 gehört zur Gattung Streptomyces und ist durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet.

a) Die Sporen sind ellipsoid. Sie haben eine Größe von 0,4-0,6 x 1,2-1,4 µ und eine glatte Oberfläche.

b) Die Farbe des Luftmyzels ist zu Anfang kreideweiß, im ausgereiften Zustand aschgrau (cinereus).

c) Die Sporenketten sind monopodial verzweigt und in lockeren Schrauben und Schlingen angeordnet.

d) Auf Pepton-Eisen-Agar wurde bei 27°C ein schwarzes Pigment gebildet. Der Stamm ist chromogen.

Die zusammengefaßten Bestimmungsmerkmale identifizieren den Stamm TÜ 901 als zur Art Streptomyces tendae Ettlinger gehörend.

2. Herstellung des Antibiotikums

2.1. Fermentation

Bei den Versuchen zur optimalen Nikkomycinproduktion (im 500 ml Erlenmeyer-Maßstab) wurden Nährlösungszusammensetzung, Belüftung sowie Impfmaterial variiert. Die resultierenden Bedingungen konnten auf den 10 l-Maßstab übertragen werden.
Abbildung 2 zeigt eine Fermentationsanalyse. Neben dem

Verlauf der Nikkomycinproduktion und des pH-Wertes ist das Myzelvolumen gegen die Zeit aufgetragen. Das Myzelvolumen wurde durch Zentrifugation von Kulturproben (Christ KS, 20°C, 4000 UpM, 10 Min.) in graduierten Zentrifugengläsern bestimmt (%).

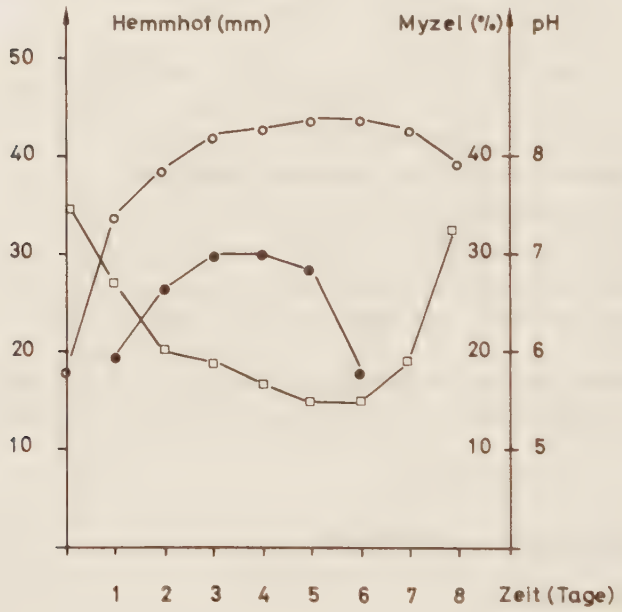


Abb. 2: 10 l-Fermentation. Nikkomycinproduktion o——o, pH-Wert □——□ und Myzelvolumen ●——● in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Plattendiffusionstest mit Mucor hiemalis (+/-).

2.2. Aufarbeitung und Reinigung

Die Kulturen der 10 l-Fermentation wurden aufgearbeitet, als ihre antibiotischen Aktivitäten im Plattendiffusionstest mit Mucor hiemalis (+/-) einen Hemmhofdurchmesser von ca. 40 mm ergaben. Dabei hatten die Kulturen einen pH zwischen 5,5 und 5,7. Das war am 4. oder 5. Tag der Fermentation der Fall. Eine Übersicht über die einzelnen Reinigungsschritte gibt Abbildung 3. Die Ausbeute an reinem Nikkomycin betrug 14% (bezogen auf die Kultur = 100%).

3. Charakterisierung

3.1. Löslichkeit

Nikkomycin löst sich sehr gut in Wasser, Eisessig und Pyridin. In den organischen Lösungsmitteln Methanol, Äthanol, Propanol, Aceton und Butanol ist es sehr schwach löslich; in Essigester, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff ist es unlöslich.

3.2. Stabilität

Das Antibiotikum ist im Bereich von pH 3-9 bei 4°C und 20°C stabil. Es wurden täglich bei den angegebenen Bedingungen Plattendiffusiontests durchgeführt. Dabei konnte während 14 Tagen kein Aktivitätsverlust des Antibiotikums in den Pufferlösungen festgestellt werden. Bei pH-Werten unter 3 ist Nikkomycin weniger stabil, verliert jedoch nur langsam seine antibiotische Aktivität. In wäßriger Lösung läßt sich Nikkomycin kurz aufkochen, ohne Aktivität zu verlieren.

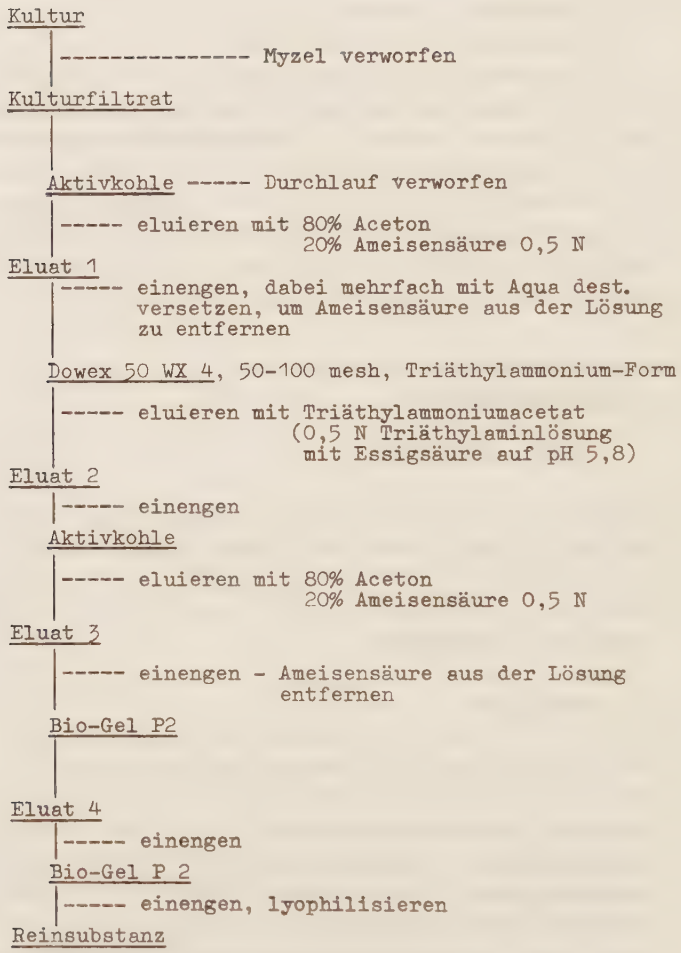


Abb. 3: Übersichtsschema für die Reinigung von Nikkomycin.

3.3. Dünnschicht- und Papierchromatographie

Das Verhalten des Antibiotikums bei der Adsorptionschromatographie an Kieselgel und bei der Verteilungschromatographie an Papier zeigen die Tabellen 1 und 2.

Tab. 1: R_f-Werte Nikkomycins bei der Chromatographie an Kieselgel mit verschiedenen Laufmittelsystemen.

Laufmittel	R_f-Wert
Butanol-Äthanol-0,1 N HCl (1 : 1 : 1)	0,49
Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 2)	0,17
Propanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (15 : 10 : 3 : 12)	0,66

Tab. 2: R_f-Werte Nikkomycins bei der Papierchromatographie.

Laufmittel	R_f-Wert
Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 2)	0,32
Propanol-Pyridin-Eisessig-Wasser (15 : 10 : 3 : 12)	0,60

3.4. Papierelektrophorese

Das Antibiotikum ist amphoter. Um den pH-Wert von 6 ist die Wanderungsstrecke klein; hier dürfte der isoelektrische Punkt liegen. Das Verhalten Nikkomycins bei der Elektrophorese zeigt Tabelle 3.

Tab. 3: Laufstrecken Nikkomycins bei der Papierelektrophorese in Abhängigkeit von den pH-Werten der Puffersysteme.

Puffer	pH	Zeit (Min.)	Laufstrecke (mm)
Pyridin-Eisessig	3,3	60	-12
Pyridin-Eisessig	6,1	60	- 1
Veronal	8,9	60	+16

3.5. Spektren

Das UV-Spektrum wurde mit einem Spektralphotometer der Fa. Beckman (DB - GT) aufgenommen. Es wurden Lösungen hergestellt, die 50 µg Nikkomycin in 1 ml 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH enthielten. Die Messung erfolgte in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke. Abbildung 4 zeigt das Spektrum. Das UV-Spektrum von Nikkomycin hat in 0,1 N HCl ein Maximum bei 288 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 298) sowie eine Schulter bei 220 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 158). In 0,1 N NaOH liegen die Absorptionsmaxima bei 305 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 202) und 242 nm ($E^{1\%}_{1cm}$ = 316).

Das IR-Spektrum (Abbildung 5) wurde mit einem Perkin-Elmer-Spectrograph, Modell 137 in KBr aufgenommen (1 mg Nikkomycin mit 300 mg KBr vermischt und zur Tablette gepreßt).

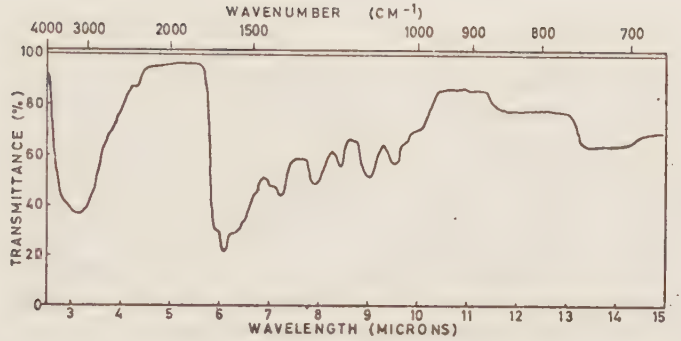


Abb. 4: IR-Spektrum von Nikkomycin; aufgenommen in KBr.

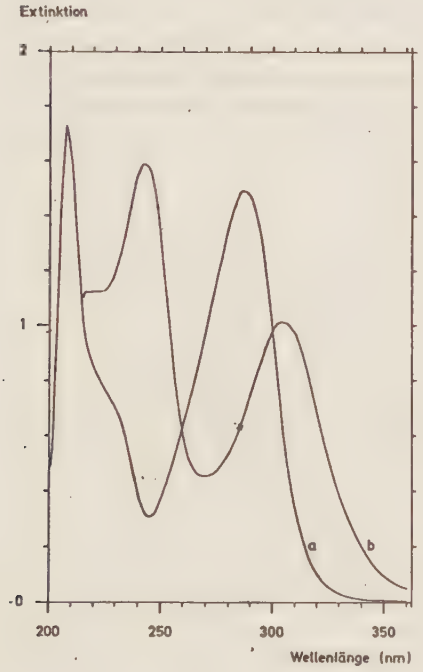


Abb. 5: UV-Spektrum von Nikkomycin; aufgenommen in 0,1 N HCl (a) und 0,1 N NaOH (b).

3.6. Eichkurven

Vom reinsten Präparat Nikkomycins wurden durch eine Verdünnungsreihe Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Alle so erhaltenen Lösungen wurden im Platten diffusionstest auf ihre antibiotischen Aktivitäten geprüft. Die resultierenden Hemmhofdurchmesser wurden in Abhängigkeit von den dekadischen Logarithmen der Konzentrationen aufgetragen. Bei dieser Wahl der Koordinatenmaßstäbe ergibt sich lineare Abhängigkeit, die sich in einer Eichkurve wiedergeben läßt. Abbildung 6 zeigt die Eichkurve für Mucor hiemalis (+/-). Zusätzlich sind die Hemmhofdurchmesser des Luftmyzelwachstums für den (+) und (-) Stamm getrennt in Eichkurven dargestellt. Es fällt einerseits die unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Stämme untereinander auf, als auch die größere Empfindlichkeit der Hemmung der Zygosporenbildung gegenüber der Hemmung der Luftmyzelien. Die Eichkurve für Botrytis cinerea: Abbildung 7.

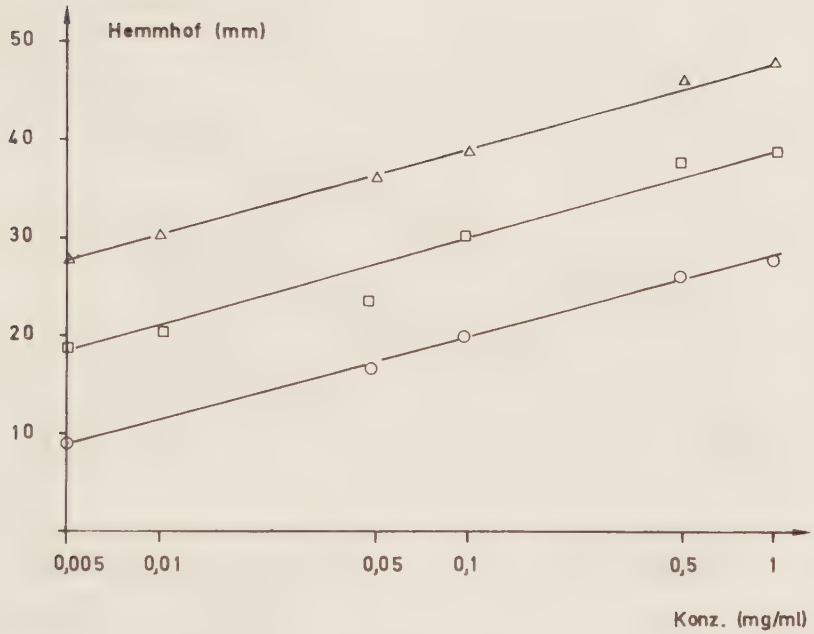


Abb. 6: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers von dem dekadischen Logarithmus der Nikkomycinkonzentration.
Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis (+/-) : △———△
Hemmung des Luftmyzelwachstums bei Mucor hiemalis (+) □——□ und (-) ○——○

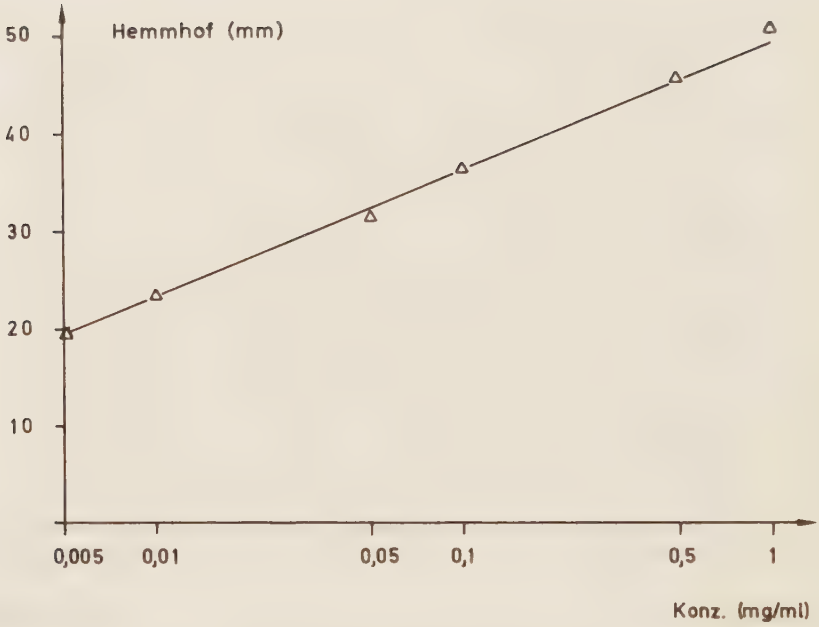


Abb. 7: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers vom dekadischen Logarithmus der Nikkomycinkonzentration bei Botrytis cinerea.

4. Wirkungsspektrum

Es wurde versucht, mit den Organismen für das Wirkungsspektrum einen Querschnitt durch das System der Pilze zu ziehen (Tabelle 4). Bakterien, soweit getestet, waren gegen Nikkomycin unempfindlich.

Tab. 4: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) Nikkomycins im Plattendiffusionstest.
T : Testanordnung (Bezeichnung nach II.4.2.1-4.)
K : Keulenbildung (+ soweit beobachtet)
1): Anzucht auf synthetischem Medium.

Organismus	T	K	MHK (µg/ml)
Bakterien	4.		
Bacillus subtilis			>100
Bacillus subtilis 1)			>100
Escherichia coli			>100
Escherichia coli 1)			>100
Streptomyces viridochromogenes			>100
Pilze			
Oomycetes	2.		
Aphanomyces stellatus			>100
Phytophthora infestans			>100
Pythium debaryanum			>100
Saprolegnia asterophora			>100
Sapromyces elongatus			>100

Tab. 4: Fortsetzung

Organismus	T	K	MHK (µg/ml)
Zygomycetes	1.		
Basidiobolus microsporus			10
Mortierella isabellina			10
Mucor hiemalis (+)			1
Mucor hiemalis (-)			5
Phycomyces blakesleeanus (+)			10
Phycomyces blakesleeanus (-)			50
Rhizopus circinans (+)			1
Rhizopus circinans (-)			1
Ascomycetes und Deuteromycetes			
Euascomycetidae			
Eurotiales	1.		
Aspergillus fumigatus			100*
Microsporum gypseum			>100
Helotiales	2.		
Botrytis cinerea		+	5
Sclerotinia fructicola		+	10
Moniliales	2.		
Thielaviopsis basicola		+	10
Melanconiales			
Fusarium larvarum	1.		50
Fusarium oxysporum	1.		10
Colletotrichum trifolii	2.	+	5
Pseudosphaeriales	2.		
Cercospora beticola		+	5

Tab. 4: Fortsetzung

Organismus	T	K	MHK (µg/ml)
Endomycetidae			
Endomycetales	3.		
Candida albicans			<100
Eremothecium ashbyi			>100
Saccharomyces cerevisiae			100
Basidiomycetes			
Ustilago maydis	3.		50
Rhizoctonia solani	2.	+	10

5. Einfluß Nikkomycins auf die DNS-, RNS-, Protein- und Chitinsynthese in vivo

Bei den Ergebnissen der Einbauversuche mit radioaktiven Vorstufen der DNS-, RNS- und Proteinsynthese gilt zu bedenken, daß lediglich die Radioaktivität des mit kalter Trichloressigsäure fällbaren Materials gemessen wurde. Mögliche Störeffekte, wie Metabolisierung der jeweiligen Vorstufen, können nicht erfaßt werden.
Anders verhält es sich bei den Versuchen zur Chitinsynthese in vivo. Die Bedingungen, denen die entnommenen Proben ausgesetzt wurden (5% KOH, 95°C, 4 Stunden), sollten außer bei Chitin, Chitosan und Cellulose zur Hydrolyse der meisten polymeren (und daher nicht filtrierbaren) Verbindungen geführt haben. Die gemessene Radioaktivität auf den Membranfiltern kann mit großer Sicherheit dem gebildeten Chitin gleichgesetzt werden.
Cycloheximid wurde bei den Einbauversuchen neben Nikkomycin eingesetzt. Es hemmt primär die Proteinsynthese bei Eukaryonten (Siegel und Sisler, 1964a, b); die Hemmung der RNS-Synthese scheint die Folge davon zu sein (deKloet, 1966).

5.1. DNS-Synthese

Mit radioaktivem Thymidin konnte kein Einbau in Zellen von Mucor hiemalis (+) erreicht werden. Störl und Venner haben 1972 für Proteus mirabilis einen verbesserten Einbau von Thymidin in DNS mit Hilfe der Zugabe von Desoxyadenosin beschrieben. Auch mit Desoxyadenosin im Versuchsansatz konnte hier kein Einbau festgestellt werden. Die Verwendung von Thymidinmonophosphat anstelle von Thymidin führte ebenfalls zu keinem Erfolg, so daß keine Aussage gemacht werden kann, ob Nikkomycin die DNS-Synthese hemmt.

5.2. RNS-Synthese

Nach 210 Minuten ist die RNS-Synthese durch Nikkomycin um 63%, durch Cycloheximid um 77% gehemmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 wiedergegeben.

5.3. Proteinsynthese

Wie Abbildung 9 zeigt, hemmt Nikkomycin 210 Minuten nach Versuchsbeginn die Proteinsynthese zu 40%, Cycloheximid zu 86%. Bis zur 120. Minute stimmen die Werte des Kontrollansatzes und des Ansatzes mit Nikkomycin gut überein. Die dann erst einsetzende Hemmung durch Nikkomycin scheint die Folge der Hemmung der RNS-Synthese zu sein.

5.4. Chitinsynthese

Bei Zugabe von Nikkomycin zum Versuchsansatz 30 Minuten nach Versuchsbeginn ist die Chitinsynthese 180 Minuten später um 80% gehemmt. Cycloheximid verursacht bei gleichem Zeitablauf eine Hemmung von 8%. Das Ergebnis des Einbauversuchs zeigt Abbildung 10. Wird Nikkomycin erst 195 Minuten nach Versuchsbeginn zugegeben, führt das zur sofortigen Hemmung. Wie aus Abbildung 11 zu ersehen ist, ergibt sich dann nach weiteren 90 Minuten eine Hemmung von 50%.

Aus den Einbauversuchen ergibt sich erwartungsgemäß, daß Cycloheximid die Protein- und RNS-Synthese hemmt, während es die Chitinsynthese nahezu unbeeinflußt läßt. Von daher sollte bestätigt sein, daß durch die verwendete Versuchsanordnung diese Makromolekülsynthesen erfaßt werden können.

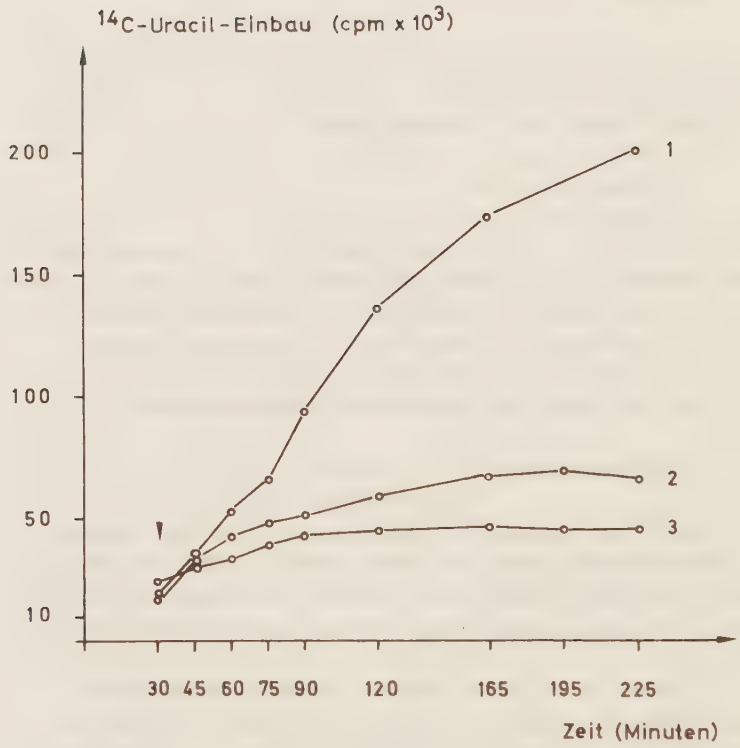


Abb. 8: Wirkung von Nikkomycin auf die RNS-Synthese in Zellen von Mucor hiemalis (+). ^{14}C-Uracil Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibiotikum-zugabe: Pfeil.
1 : Kontrolle
2 : Nikkomycin 0,5 µg/ml
3 : Cycloheximid 10 µg/ml

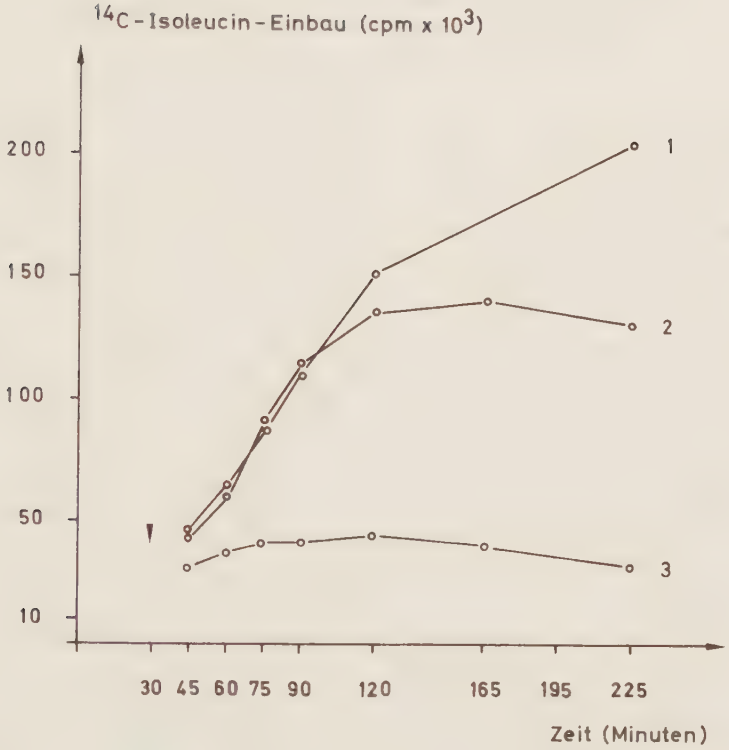


Abb. 9: Wirkung von Nikkomycin auf die Proteinsynthese in Zellen von Mucor hiemalis (+). ^{14}C-Isoleucin Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibiotikumzugabe: Pfeil.

1 : Kontrolle

2 : Nikkomycin 0,5 µg/ml

3 : Cycloheximid 10 µg/ml

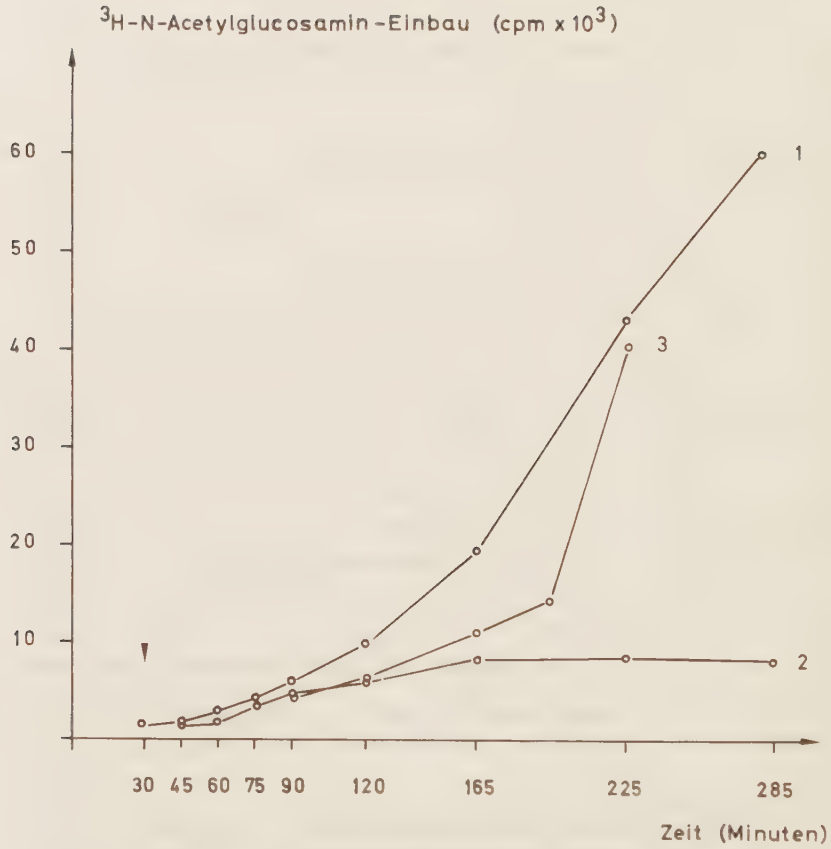


Abb. 10: Wirkung von Nikkomycin auf die Chitinsynthese in Zellen von Mucor hiemalis (+). ^{3}H-N-Acetyl-D-glucosamin Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibiotikumzugabe: Pfeil.

1 : Kontrolle

2 : Nikkomycin 0,5 µg/ml

3 : Cycloheximid 10 µg/ml

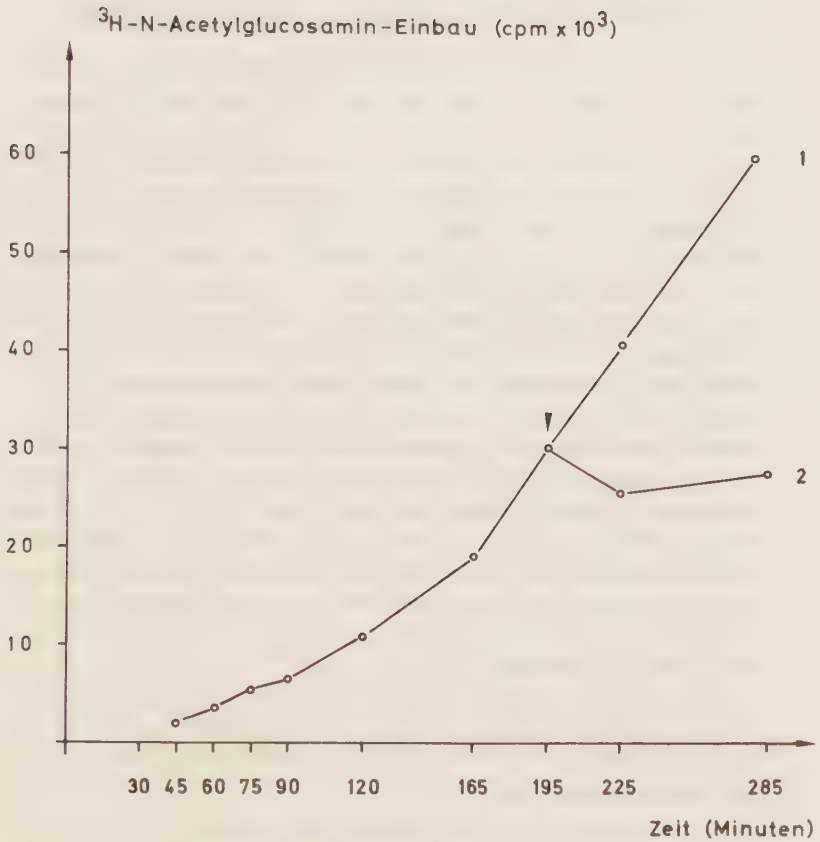


Abb. 11: Wirkung von Nikkomycin auf die Chitinsynthese in Zellen von Mucor hiemalis (+). ^{3}H-N-Acetyl-D-glucosamin Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibiotikumzugabe: Pfeil.
1 : Kontrolle
2 : Nikkomycin 0,5 µg/ml

6. Einfluß Nikkomycins auf die Chitinsynthese in vitro

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V : Bildung von Chitin (dpm) / 20 Minuten) von der Substratkonzentration (S : UDP-GlcNAc (mM); spezifische Aktivität 500 µCi/mmol) wurde untersucht. Das geschah in einer Kontrollreihe ohne und in einer Versuchsreihe mit Nikkomycin (Endkonzentration 0,25 µg/ml). Wie Abbildung 12 zeigt, ist in sehr schwacher Ausprägung ein sigmoider Kurvenverlauf der Sättigungskurve des Kontrollansatzes zu beobachten. In Gegenwart von Nikkomycin ist die Sigmoidität des Kurvenverlaufs verstärkt. In Abbildung 13 sind die Werte aus Abbildung 12 in einem Diagramm nach Lineweaver und Burk (1934) wiedergegeben. Die Werte hoher UDP-GlcNAc-Konzentrationen in reziproker Auftragung gegen die reziproken Werte der Reaktionsgeschwindigkeit ergeben in beiden Ansätzen linearen Verlauf. Bei niedrigen Konzentrationen verlaufen die Werte in nach oben konkav gekrümmten Kurven. Der gemeinsame Schnittpunkt beider Kurven auf der 1/V-Achse läßt auf einen kompetitiven Hemmungsmechanismus schließen. Aus dem Schnittpunkt konnte die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden: 6250 dpm / 20 Minuten.
Die Verlängerung der Geraden des Kontrollansatzes im negativen Bereich der Koordinaten führt zum Schnittpunkt mit der 1/S-Achse und gibt den $1/K_m$-Wert für UDP-GlcNAc an. Die Michaeliskonstante ist 0,35 mM.

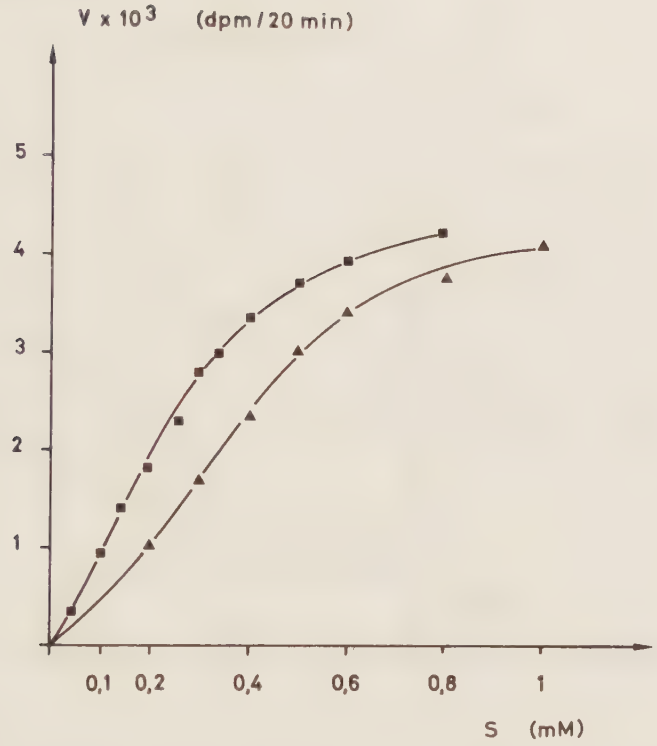


Abb. 12: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (V : Bildung von Chitin (dpm) / 20 Minuten) von der UDP-GlcNAc-Konzentration (S (mM)).
■ : Kontrolle
▲ : Nikkomycin 0,25 µg/ml

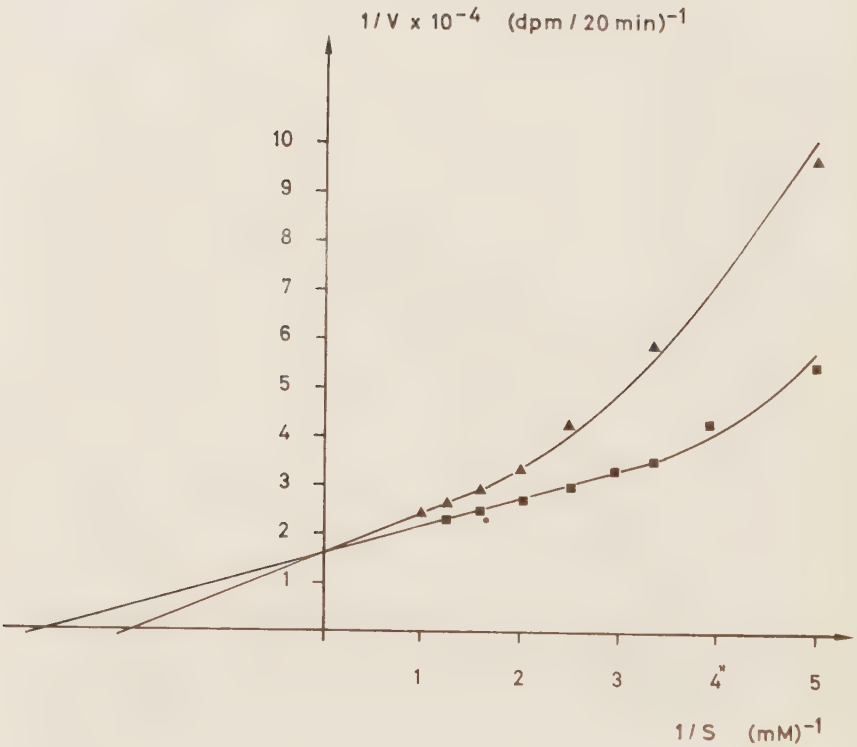


Abb. 13: Lineweaver-Burk-Diagramm der Werte aus Abbildung 12.

7. Pflanzenversuche mit Nikkomycin

7.1. Prüfung auf Phytotoxizität

7.1.1. Keimungstest mit verschiedenen Getreidesamen

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt und geben für jeden Testansatz die Mittelwerte aus 20 gleichbehandelten Sämlingen wieder. Es fällt auf, daß die verwendete Gersten- und Roggensorte eine nur wenig erkennbare Empfindlichkeit gegen das Antibiotikum aufweist. Es läßt sich hier nur eine geringe Hemmung des Wurzelwachstums feststellen (Gerste 8%, Roggen 10% Hemmung bei höchster Nikkomycinkonzentration). Für die getestete Hafersorte weist das Antibiotikum eine mittlere Toxizität auf (25% Hemmung). Nur die Weizen- und Reiskeimung unterliegen einer deutlichen Hemmung von 55% und 48%.

Tab. 5: Einfluß von Nikkomycin auf das Wurzelwachstum bei verschiedenen Getreidesamen.

		Konzentration (mg/ml)			
		0,5	0,1	0,05	Kontrolle
Weizen	Wurzellänge (mm)	8	10	14	18
Gerste		11	12	13	12
Roggen		16	18	14	18
Hafer		22	20	24	29
Reis		12	15	15	23

7.1.2. Versuche mit ebenerdig abgeschnittenen Tomatenpflanzen

Die Tomatenpflanzen zeigten während und nach der Behandlung mit Nikkomycin keine krankhaften Veränderungen. Bei Versuchsende bestand hinsichtlich Gewicht, Größe und Aussehen kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrollpflanzen.

7.2. Versuche zur Aufnahme und zum Transport in Tomatenpflanzen

7.2.1. Konzentrationsbedingte Aufnahme

Abbildung 14 zeigt als Ergebnis den linearen Zusammenhang zwischen der Antibiotikumskonzentration in der Nährlösung zu Beginn des Versuchs und der Antibiotikumskonzentration in den Testpflanzen bei Versuchsende. Innerhalb der verwendeten Konzentrationsgrenzen scheint somit die Pflanze die Aufnahme des Antibiotikums nicht kontrollieren zu können.

7.2.2. Verteilung des Antibiotikums in der Pflanze

Abbildung 15 gibt die von der Pflanze aufgenommene Menge des Antibiotikums zu bestimmten Zeiten wieder. Die Zufuhr Nikkomycins erfolgte während 48 Stunden. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Weiterleitung des Antibiotikums von dem unteren Teil der Pflanze an den mittleren und oberen Teil nur langsam geschieht. Nach anfänglich rascher Aufnahme in den unteren Teil erscheint nach 18 Stunden eine Verzögerung.

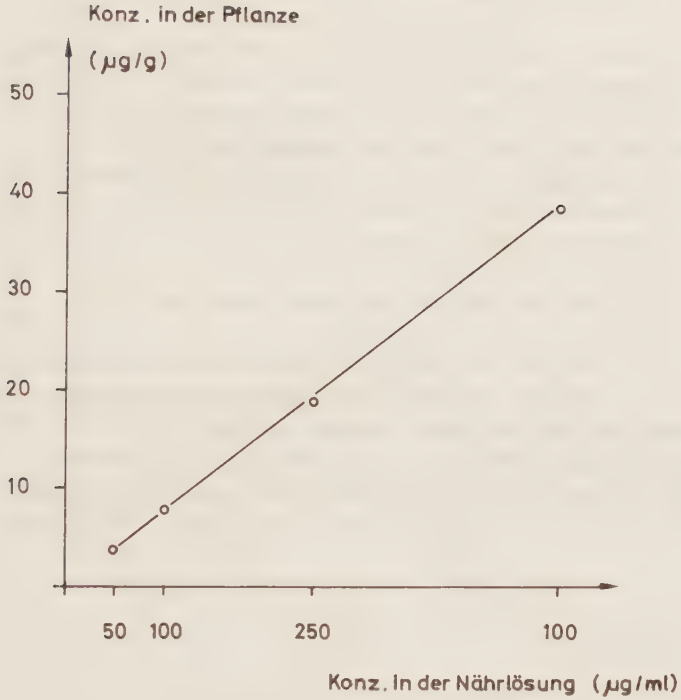


Abb. 14: Abhängigkeit der Konzentration Nikkomycins in der Pflanze (bei Versuchsende) von der Konzentration in der Nährlösung (bei Versuchsbeginn).

7.2.3. Verteilung des Antibiotikums in der Pflanze nach Zufuhrstopp

Das Ergebnis zeigt Abbildung 15. Vom unteren Teil der Pflanze gelangt das Antibiotikum weiterhin in den mittleren, während im oberen Teil keine Zunahme mehr festzustellen ist. Hier nimmt die ohnehin sehr kleine Konzentration langsam weiter ab. 24 Stunden nach Zufuhrstopp verringert sich die Nikkomycinkonzentration schnell; ab 45 Stunden nur allmählich.

7.2.4. Aufnahme des Antibiotikums durch das Blatt

Von 10 Pflanzen zeigten 6 nach einer Woche eine Aufnahme in die übrigen Teilblättchen des selben Blattstiels. Allerdings war die Aufnahme unterschiedlich. In 4 Fällen wurde in dem ganzen Restblatt eine Konzentration von 28-30 µg/g beobachtet; in 2 Fällen eine Konzentration von 1 µg/g. Die benachbarten Blätter enthielten kein Antibiotikum.

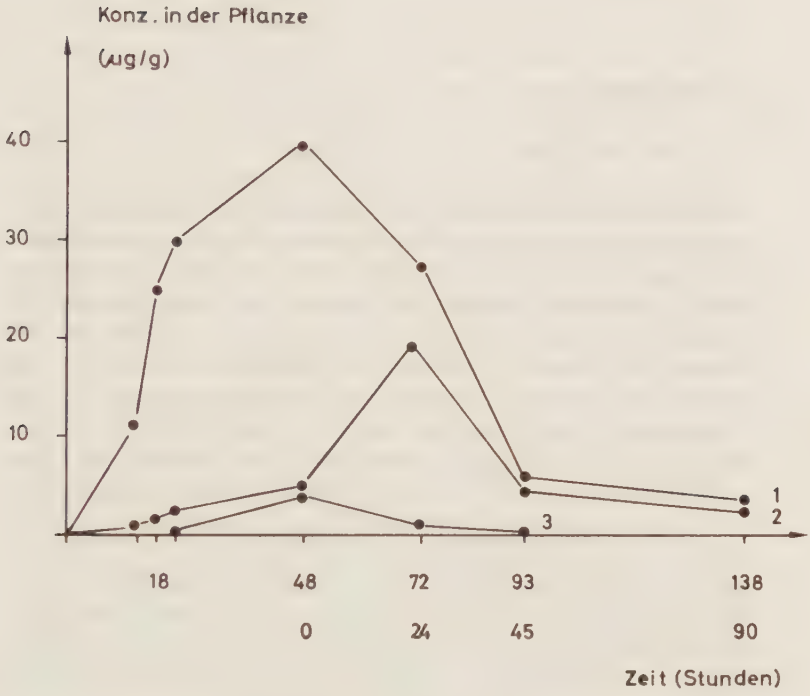


Abb. 15: Verteilung Nikkomycins in der Pflanze. Zufuhr des Antibiotikums in den ersten 48 Stunden; dann Zufuhrstopp.
1 : unterer Teil der Pflanze
2 : mittlerer
3 : oberer

IV DISKUSSION

1. Wirkungsweise

1.1. Chitinsynthese

Die Ergebnisse aus den in vivo Versuchen zur Wirkungsweise erwiesen sich als richtig, indem sie auf die Chitinsynthese als primären Wirkort von Nikkomycin deuteten. Schon die ersten Anzeichen, Bildung von Keulen bzw. protoplastenähnlichen Strukturen bei Botrytis cinerea, Mucor hiemalis und anderen Pilzen unter Einfluß von Nikkomycin, wiesen auf eine Störung des Aufbaus der Zellwand hin. Bartnicki-Garcia und Nickerson (1962) haben die chemische Zusammensetzung der Zellwand bei Mucor rouxii untersucht. Sie fanden, daß neben verschiedenen anderen Polysacchariden Chitin zusammen mit Chitosan über 40% des Zellwandmaterials ausmacht. Nachdem sich die Unwirksamkeit Nikkomycins gegenüber den getesteten Vertretern der Oomycetes (ihre Zellwände enthalten kein Chitin) herausgestellt hatte, gaben die Einbauversuche mit radioaktiven Vorstufen der untersuchten Makromolekülsynthesen den sicheren Hinweis auf die Chitinsynthese als Wirkort.

Glaser und Brown gelang 1957 die erste Chitinbiosynthese mit zellfreien Extrakten von Neurospora crassa. Sie zeigten, daß UDP-GlcNAc die unmittelbare Vorstufe für die Chitinsynthese ist. Andere Autoren haben dies in ihren Arbeiten bestätigt. McMurrough et al. (1971) und McMurrough und Bartnicki-Garcia (1971) fassen die bisherigen Ergebnisse zusammen und beschreiben, vor allem auf eigene Versuche gestützt, folgenden Biosyntheseweg für Chitin:

Eine ATP abhängige Kinase (N-Acetyl-D-glucosaminkinase)

phosphoryliert GlcNAc in Position 6. Da bisher nur GlcNAc-1-P als Komponente der Pyrophosphorylase-Reaktion bekannt ist (UDP-N-acetyl-D-glucosaminpyrophosphorylase, Glaser und Brown, 1955), muß die Umwandlung von GlcNAc-6-P in GlcNAc-1-P durch N-Acetyl-D-glucosaminphosphomutase erfolgt sein. Dieses Enzym wurde schon 1953 von Leloir und Cardini und von Reissig 1956 bei Neurospora crassa beschrieben. Als Kofaktor benötigt es Glucose-1,6-diphosphat. UDP-N-acetyl-D-glucosaminpyrophosphorylase führt mit UTP die Synthese zu UDP-GlcNAc aus, von welchem schließlich GlcNAc durch Chitinsynthetase in Chitin eingebaut wird. Es ist unklar, ob bei dem letzten Syntheseschritt ein Lipidkofaktor beteiligt ist. McMurrough und Bartnicki-Garcia (1971) fanden eine 2-6 fache Stimulierung der Chitinbiosynthese bei Mucor rouxii durch Lipidrohextrakte, jedoch keinen Einbau von Radioaktivität (von UDP-^{14}C-GlcNAc) in einen möglichen Lipidkofaktor.

Es wurde schon die Frage angeschnitten, wo die Chitinsynthetase in der Zelle lokalisiert sein könnte (II.10.). McMurrough et al. (1971) und McMurrough und Bartnicki-Garcia (1971) vermuten eine Verknüpfung des Enzyms mit Strukturen der Zellwand. Es wurde in diesen Arbeiten nicht geklärt, ob den Zellwandpräparationen noch Reste der Cytoplasmamembran anhafteten. Jan (1974) vermutet nämlich, daß die Chitinsynthetase an die Cytoplasmamembran gebunden ist. Er verwendete Zellwandpräparationen von Phycomyces blakesleeanus, wobei die Zellwände noch mit der Cytoplasmamembran verbunden waren. Nach den Ergebnissen von Keller und Cabib (1971) muß man annehmen, daß die Chitinsynthetase (von Saccharomyces carlsbergensis) nicht an der Außenseite der Membran lokalisiert ist. Ihrer Meinung nach spricht dafür, daß Polyoxin A zwar eine starke Hemmung der Chitinsynthetase in vitro, jedoch keine Beeinträchtigung des Wachstums von

Saccharomyces carlsbergensis bewirken kann; ferner vermag Polyoxin A bei Sphaeroplasten nicht die Bildung von Chitin zu verhindern. Es kann somit angenommen werden, daß die Cytoplasmamembran für Substrate oder Inhibitoren des Enzyms eine Eindringungsbarriere darstellt. Hierher gehört auch die Beobachtung von Endo et al. (1970), daß das Chitinsynthetase-System in vitro viel empfindlicher gegenüber Polyoxin D ist als die wachsende Zelle. Bei Nikkomycin konnte ein derartiger Unterschied nicht festgestellt werden. Für die Vorstellung, daß die Chitinsynthetase ein membrangebundenes Enzym ist, spricht auch, daß an der Chitinsynthese ein Lipidfaktor beteiligt sein könnte (McMurrough und Bartnicki-Garcia, 1971).

Die Versuche mit der partikulären Chitinsynthetase haben sehr wahrscheinlich gemacht, daß es sich bei Nikkomycin um einen kompetitiven Hemmstoff von UDP-GlcNAc handelt. Aus dem V/S-Diagramm geht ein schwacher sigmoider Kurvenverlauf für den Kontrollansatz, eine verstärkte Sigmoidität der Sättigungskurve des Ansatzes mit Nikkomycin hervor. Der sigmoide Verlauf der Sättigungskurven im V/S-Diagramm und ebenfalls die reziproke Darstellung deuten auf positiv kooperatives Verhalten des UDP-GlcNAc hinsichtlich seiner Affinität zur Chitinsynthetase. Nach Betz (1974) bedeutet das: Die Bindung von Substratmolekülen verändert das Enzym so, daß seine Affinität zum Substrat wächst. Kooperatives Verhalten wurde bisher nur bei Enzymen gefunden, deren Molekül aus mehreren Peptidketten zusammengesetzt ist und die mehrere katalytische Zentren aufweisen (Betz, 1974).

Die Ergebnisse dieser Versuche stehen in Übereinstimmung mit Befunden von McMurrough und Bartnicki-Garcia (1971). Die spezifische Aktivierung der Chitinsynthese durch GlcNAc und die damit verbundene Reduzierung des ohne GlcNAc sigmoiden Kurvenverlaufs wird beschrieben. Daraus wird gefol-

gert, daß außer GlcNAc auch UDP-GlcNAc ein positiv-allosterischer Effektor ist. Nikkomycin könnte somit als negativ-allosterischer Effektor angesehen werden.

Ein Vergleich der bisher ermittelten Michaeliskonstanten für UDP-GlcNAc bei der Chitinbiosynthese mit der Konstante aus dieser Arbeit (Tabelle 6) ergibt, besonders bei den Werten aus den Versuchsansätzen mit Enzympräparationen aus Zygomyzeten, gute Übereinstimmung.

Tab. 6: Bisher ermittelte Michaeliskonstanten für UDP-GlcNAc bei der Chitinbiosynthese.

Organismus	K_m (mM)	
Allomyces macrogynus	1,20	Porter und Jaworski (1966)
Neurospora crassa	1,43	Endo et al. (1970)
Saccharomyces carlsbergensis	0,6-0,9	Keller und Cabib (1971)
Mucor rouxii	0,50	McMurrough et al. (1971)
Phycomyces blakesleeanus	0,60	Jan (1974)
Mucor hiemalis	0,35	diese Arbeit

1.2. RNS-Synthese

Neben der Wirkung von Nikkomycin auf die Chitinsynthese wurde eine starke Hemmung der RNS-Synthese beobachtet. Dabei bleibt offen, ob die Hemmung durch einen Angriff entweder auf die DNS-Matrize oder auf die RNS-Polymerase zustande kommt. Ebenso wäre ein Eingriff in die Phosphorylierung der RNS-Vorstufen denkbar. Als Ursache für diese Hemmung können folgende Punkte diskutiert werden.

1.2.1. Die um 63% verminderte RNS-Synthese könnte die Folge der Hemmung der Chitinsynthese sein

Für diese Annahme spräche das Ergebnis, daß die maximale Hemmung (ca. 90%) bei der Chitinsynthese in vivo mit kleineren Konzentrationen an Nikkomycin erreicht wird als bei der RNS-Synthese. Abbildung 16 zeigt die Stärke der Hemmung in Abhängigkeit von der Nikkomycinkonzentration bei der Chitin- und RNS-Synthese in vivo.

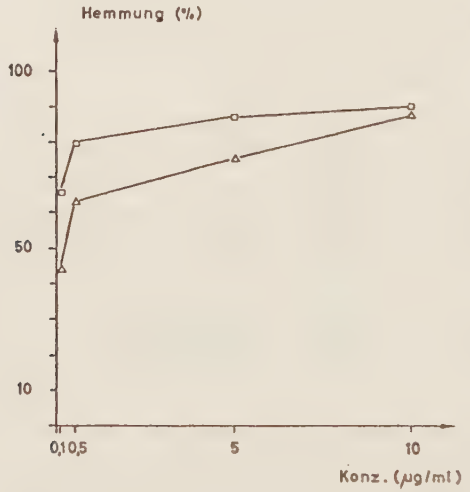


Abb. 16: Abhängigkeit der Stärke der Hemmung von der Nikkomycinkonzentration bei der RNS-: △——△ und bei der Chitinsynthese: □——□

Die Instabilität der unter Nikkomycineinfluß entstehenden protoplastenähnlichen Strukturen kann nicht zur Erklärung dieser Hemmung herangezogen werden. In ergänzenden Ver-

suchen wurden die Einbauversuche aus II.9. variiert, indem die Sporen von Mucor hiemalis (+) in einem Medium angezogen wurden, das zur Stabilisierung der Protoplasten 20% Saccharose enthielt. Dabei ergab sich ebenfalls eine 60 prozentige Hemmung des Uracileinbaus bei einer Nikkomycinkonzentration von 0,5 µg/ml.

Die Vermutung, daß die Hemmung der Chitinsynthese durch Nikkomycin eine Hemmung der RNS-Synthese zur Folge haben könnte, wird durch folgende Überlegung gestützt. Die Hemmung der Chitinsynthese führt zur Anhäufung von End- und/oder Zwischenprodukten des Chitinbiosynthesewegs. Dadurch könnte über ein komplexes Regulationsgeschehen die RNS-Synthese oder die Bereitstellung ihrer Bausteine negativ beeinflußt werden. Endo et al. (1970) beschrieben eine Zunahme von UDP-GlcNAc in Zellen von Neurospora crassa unter Polyoxin D-Einfluß. Sasaki et al. (1968) konnten jedoch keinen Einfluß von Polyoxin D auf die DNS- und RNS-Synthese feststellen; allerdings bedienten sie sich einer Methode (Einbau von ^{32}P in DNS- und RNS-Fraktionen von Cochliobolus miyabeanus), deren Ergebnisse keinen direkten Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit erlauben. Daher könnten erst gezielte Hemmversuche der RNS-Synthese mit Polyoxin D und Nikkomycin Aufschluß darüber geben, ob es Regulationsmechanismen gibt, die Chitin- und RNS-Synthese miteinander verbinden.

Weitere Versuche zur RNS- und Proteinsynthese in vivo mit Mucor hiemalis (+) zur Zeit der Sporenkeimung (Vorinkubation 5 anstatt 10 Stunden) ergaben, daß die Hemmung der RNS-Synthese durch Nikkomycin nur undeutlich ausgeprägt war. Die Proteinsynthese war nicht gehemmt. Das veranschaulichen die Abbildungen 17 und 18. Nishi fand 1961, daß in Sporen von Aspergillus niger nach Inkubation von 4-5 Stunden der RNS-Umsatz erhöht war. Sussman (1966) nimmt ebenfalls

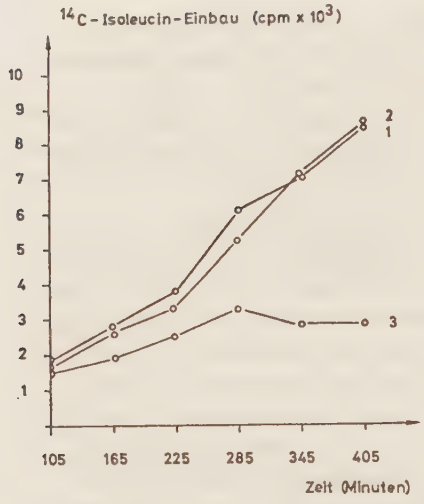


Abb. 17: Wirkung Nikkomycins auf die Proteinsynthese in keimenden Sporen von Mucor hiemalis (+). ^{14}C-Isoleucin-Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibiotikumzugabe: 30 Min. nach Versuchsbeginn
1 : Kontrolle
2 : Nikkomycin 0,5 µg/ml
3 : Cycloheximid 10 µg/ml

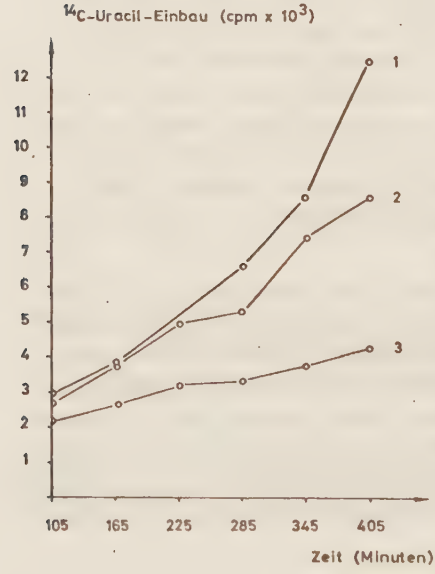


Abb. 18: Wirkung Nikkomycins auf die RNS-Synthese in keimenden Sporen von Mucor hiemalis (+). ^{14}C-Uracil-Einbau (cpm) gegen die Zeit aufgetragen. Antibiotikumzugabe: 30 Min. nach Versuchsbeginn
1 : Kontrolle
2 : Nikkomycin 0,5 µg/ml
3 : Cycloheximid 10 µg/ml

an, daß die Sporenkeimung von der mRNS-Synthese und der folgenden Aufreihung der Ribosomen zu Polysomen begleitet wird. Zur Zeit dieser Vorgänge während der Sporenkeimung kann sich eine Hemmung der Chitinsynthese und als Folge eine Hemmung der RNS-Synthese noch nicht manifestieren; erst nach der RNS-Synthese sollte man die Bildung der zellwandsynthetisierenden Enzyme erwarten. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Hemmung der RNS-Synthese in Gegenwart von Nikkomycin auf einem Regulationseffekt beruht, der durch den Aufstau von Komponenten der Chitinsynthese hervorgerufen wird. Da ein Effekt dieser Art bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde, muß die Frage nach einer möglichen Kontrollierbarkeit der RNS-Synthese durch die Chitinsynthese spekulativ bleiben.

1.2.2. Die Hemmung der RNS-Synthese in vivo könnte auf einem direkten Eingriff Nikkomycins in den Nukleinsäurestoffwechsel beruhen

Da der Einfluß Nikkomycins auf die DNS-Synthese nicht geprüft werden konnte, bleibt unklar, ob die Hemmung der RNS-Synthese die Folge einer möglichen Hemmung der DNS-Synthese ist.

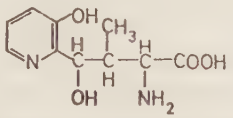
Die Strukturanalogie zwischen den Polyoxinen und UDP-GlcNAc ist die Basis für die Hemmung der Chitinsynthetase (Hori et al., 1971). Von der Wirkungsweise Nikkomycins her wäre ebenso eine Strukturanalogie zwischen Nikkomycin und UDP-GlcNAc denkbar (siehe auch IV.2.). Als Nukleotidanaloges könnte Nikkomycin einmal mit der DNS-Matrize in Interaktion treten. Auf der anderen Seite wäre eine Reaktion mit der RNS-Polymerase vorstellbar. Wenn man bedenkt, daß die größte Zahl allosterischer Effektoren von Purin- und Pyrimidinnukleotiden repräsentiert wird (Miller

gibt davon einen Überblick, 1973), könnte Nikkomycin schließlich als Nukleotidanaloges außer für die Chitinsynthetase auch für ein Enzym des Nukleotidstoffwechsels ein negativer Effektor sein. In Betracht kämen besonders die Enzyme, die vorhandenes Uracil zu Uridinmonophosphat (Uracil:Phosphoribosyltransferase) oder Uracil zu Uridin (Uridinphosphorylase) umsetzen können. Zu denken wäre auch an das Enzym, das Uridin zur Synthese von Uridinmonophosphat (Uridinkinase) verwerten kann, sowie an die Kinasen, die weiter zu Uridindi- und Uridintriphosphat führen. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, daß die Uridinkinase durch UTP und CTP gehemmt wird (Orengo, 1969).

Die Tatsache, daß zur Zeit der Sporenkeimung nur eine undeutliche Hemmung der RNS-Synthese festzustellen war, macht die Annahme der Interaktion Nikkomycins mit der DNS-Matrize sowie seine Reaktion mit der RNS-Polymerase sehr unwahrscheinlich. Die verstärkte RNS-Synthese bei der Sporenkeimung sollte für Hemmstoffe mit solcher spezifischen Wirkung besonders anfällig sein. Diese Überlegung schließt eine Wirkung Nikkomycins auf die Enzyme, die vorhandenes Uracil zur Synthese von Uridinphosphaten verwerten können ("salvage mechanism"), nicht aus. Es muß vermutet werden, daß die Bausteine der RNS-Synthese für den ersten Syntheseschub in den ruhenden Sporen gespeichert sind (Gottlieb, 1966). Erst mit dem Verbrauch dieser Bausteine und in größerem Maße anlaufender RNS- und Proteinsynthese sollte man hier eine spezifische Hemmung der Eigenproduktion von Nukleotiden und der Verwertung ihrer Vorstufen erwarten.

2. Aspekte der Chemie von Nikkomycin

Die bisherige Bearbeitung Nikkomycins am Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Tübingen hat zu folgenden Ergebnissen geführt: Molekulargewicht 403-406; Summenformel $C_{16}H_{20}N_4O_8$. Dieses Ergebnis stimmt gut überein mit der Interpretation eines ^{13}C-Resonanzspektrums von Nikkomycin. Hieraus wurden 16 C-Atome (evtl. 18) ermittelt. Nach der Hydrolyse mit 6 N HCl konnte ein Produkt isoliert werden, das die Summenformel $C_{10}H_{14}N_2O_4$ hat. Für diese Verbindung, die keine antibiotische Aktivität besitzt, wird folgende Struktur vorgeschlagen:



Ob das fehlende Stück mit der ungefähren Bruttoformel $C_6H_6N_2O_4$ mit einem Pyrimidinteil in Beziehung steht, ist noch offen. Eine Ähnlichkeit mit den Polyoxinen läßt sich beim jetzigen Stand der chemischen Bearbeitung weder belegen noch ausschließen.

Hori et al. (1971) haben den Einfluß der Struktur der Polyoxine (A-M) auf die Hemmung der Chitinsynthetase aus Piricularia oryzae untersucht. Sie fanden, daß eine Grundstruktur der Polyoxine, 5-Amino-5-deoxyuridin (Teil I), ein kompetitiver Hemmstoff des Enzyms ist. Polyoxamsäure, eine andere wichtige Teilstruktur (Teil II) besitzt keine inhibitorische Aktivität. In Abbildung 19 ist die Grundstruktur der Polyoxine der Struktur von UDP-GlcNAc gegenübergestellt. Hori et al. (1971) nehmen an, daß es ein Bindungszentrum und ein katalytisches Zentrum an der Chitinsynthetase gibt. Während der Nukleosidteil von UDP-GlcNAc das Bindungszentrum fest besetzt, ist der übrige Teil des Moleküls nur lose gebunden. Man stellt sich nun vor, daß die Hemmung der

Chitinsynthetase dadurch zustande kommt, daß der Nukleosidteil der Polyoxine und von UDP-GlcNAc um das Bindungszentrum des Enzyms konkurrieren. Zusätzlich vermag Teil II der Polyoxine die Bindung von Teil I zu verstärken.

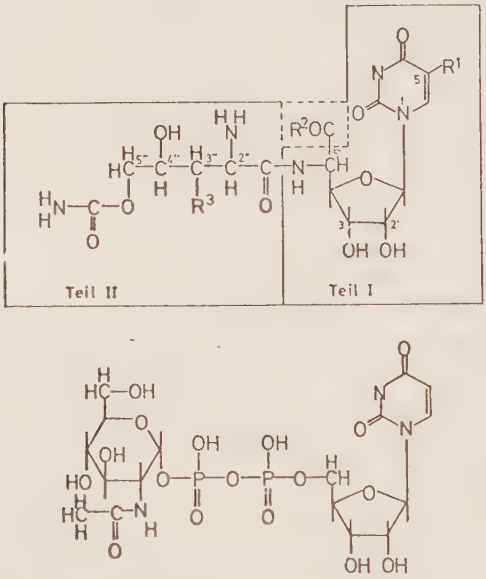


Abb. 19: Allgemeine Struktur der Polyoxine (oben) und Struktur von UDP-GlcNAc (nach Hori et al., 1971).

Es ist zu vermuten (Hori et al., 1971), daß das Bindungszentrum der Chitinsynthetase komplementäre Strukturen zu Uridin und seinen Derivaten besitzt, die in Position 5 folgende Substituenten tragen: $-CH_3$, $-CH_2OH$ und -COOH. Diese Vermutung wird durch Ergebnisse von Hori et al. (1974 a, b) gestützt, daß außer Polyoxin C (Teil II fehlt)

und seinen verschiedenen Derivaten einige Uridinanaloge kompetitive Inhibitoren der Chitinsynthetase sind. Komplementäre Strukturen dürften auch für die Carbamoylpolyoxamsäure am Enzym vorhanden sein (Hori et al., 1974 a). Vorläufig wurde von Hori et al. (1974 b) wahrscheinlich gemacht, daß eine ungeladene Imidazolgruppe und eine geladene Aminogruppe der Chitinsynthetase an der enzymatischen Reaktion beteiligt sind.
Die Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung haben gezeigt, daß die meisten zu UDP-GlcNAc kompetitiven Hemmstoffe der Chitinsynthetase eine bestimmte Struktur aufweisen: 2,4-Dioxypyrimidinnukleosid, das vorzugsweise in Position 5 die Substituenten $-CH_3$, $-CH_2OH$ oder COOH besitzt. Hori et al. (1974 a) haben gefunden, daß die Enzymaktivität auch durch GMP, dTMP, UMP, UDP, GDP-Glucose, GDP-Mannose, dTDP-Glucose, UDP-Glucose und UDP-Mannose bei Konzentrationen um 10 mM gehemmt wird. Hori et al. (1974 a) nehmen an, daß der durch Guanosin und Analoge bewirkte Hemmechanismus sich von dem durch Uridin- oder dThymidinanaloge verursachten unterscheidet.

Überträgt man die Erkenntnisse aus diesen Versuchen auf die Ergebnisse dieser Arbeit, so läßt sich für Nikkomycin eine Nukleosiden ähnliche Struktur denken. Die Hemmung der Chitinsynthetase durch Nikkomycin wird mit einer Konzentration erreicht (0,25 µg/ml : 30% Hemmung), die in der Größenordnung liegt, wie sie für die Polyoxine beschrieben wurde (z.B. Polyoxin B - 10 µg/ml : 64% Hemmung; Polyoxin D - 10 µg/ml : 47%; Hori et al., 1971). Die Größenordnung ist vergleichbar, weil Nikkomycin und Polyoxine ähnliche Molekulargewichte haben. Um solche Hemmeffekte zu bekommen, müssen die aufgeführten Nukleoside, Nukleotide und ihre Analoge in Konzentrationen eingesetzt werden, die um den Faktor 100-1000 größer sind. Von daher

ist für Nikkomycin eine den Polyoxinen ähnliche Struktur zu erwarten. Die Erkenntnisse aus der chemischen Bearbeitung Nikkomycins erlauben allerdings noch keine Vergleiche in dieser Richtung.

Anhand der bisher ermittelten Ergebnisse wurde Nikkomycin mit anderen wasserlöslichen antifungischen Antibiotika verglichen. Es hat Ähnlichkeit mit den Polyoxinen, Ablastmycin (Hashimoto et al., 1968), Bulgerin (Shoji et al., 1970) und dem Antibiotikum 24010 (Mizuno et al., 1971). Das sind alles Substanzen, die außer einem charakteristischen UV-Spektrum (das auf eine Purin- oder Pyrimidinkomponente im Molekül hinweist) die antibiotische Wirkung gegen einige phytopathogene Pilze gemeinsam haben.
Die Identität Nikkomycins mit den Polyoxinen (Unterscheidungsmerkmal: unterschiedliche Stabilität, UV-Spektrum), Ablastmycin (UV-Spektrum, Summenformel) und dem Antibiotikum 24010 (UV-Spektrum, Summenformel) kann ausgeschlossen werden. Obwohl Nikkomycin im UV-Spektrum als auch in den R_f-Werten bei der Dünnschicht- und Papierchromatographie mit Bulgerin gut übereinstimmt, ist auch hier eine Identität auszuschließen (Bulgerin: $C_{17}H_{24}O_{10}N_4$ - MG 444).
Bulgerin wurde aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces aburaviensis var. tuftformis*) teilweise gereinigt. Vergleichbare Präparate von Nikkomycin und Bulgerin zeigten bei der Chromatographie an dem Kationenaustauscher M-72 (Fa. Beckman, München) ein unterschiedliches Elutionsverhalten (Hagenmaier, 1974).
Die vorliegenden Ergebnisse erlauben, Nikkomycin als neues Antibiotikum anzusehen.

---

*) Für die Überlassung des Stammes danke ich Y. Yasuda, Shionogi Research Laboratory, Shionogi and Co., Ltd., Fukushima-ku, Osaka, Japan.

3. Pflanzenversuche

Der Keimungstest mit verschiedenen Getreidesamen war durch seine einfache Handhabung, seine große Empfindlichkeit und die außerordentlich gute quantitative Auswertbarkeit das geeignete Mittel, einen deutlichen Hinweis auf eine mögliche Phytotoxizität von Nikkomycin zu geben. Die Hemmung des Wurzelwachstums der verschiedenen Getreidesamen ist nur unbedeutend (Ausnahme Reis) bei einer Konzentration Nikkomycins (50 µg/ml), die für eine Anwendung bei ausgewachsenen Pflanzen in Frage kommen könnte. Die von den Versuchen mit abgeschnittenen Tomatenpflanzen erwartete gedämpfte Empfindlichkeit des Toxizitätsnachweises konnte festgestellt werden. Obwohl die Pflanzen dem gleichen Konzentrationsbereich von Nikkomycin ausgesetzt waren, zeigten sie keinerlei Beeinträchtigungen. Die Verträglichkeit Nikkomycins durch die Tomatenpflanzen war die Grundlage für weitere Versuche.
Für die zum Teil beträchtliche Hemmung des Wurzelwachstums der verschiedenen Getreidekeimlinge bei den höheren Nikkomycinkonzentrationen könnte die in Betracht gezogene Wirkung Nikkomycins auf den Nukleotidstoffwechsel auch hier verantwortlich gemacht werden. Als Eukaryonten stehen sich Pilz und Pflanze systematisch und daher hinsichtlich ihres Stoffwechsels nahe. Deshalb sollte man bei ihnen auch gemeinsame Angriffsorte für, oder Wirkungsmechanismen von Hemmstoffen erwarten.

Die Versuche zur Aufnahme und zum Transport in Tomatenpflanzen ergaben, daß Nikkomycin als Systemikum den Pflanzen durch die Wurzeln zugeführt und über die Wasserleitungsbahnen in ihnen verteilt werden kann. Wurden Blätter der Testpflanzen Nikkomycin ausgesetzt, ließ sich nach seiner Aufnahme ebenfalls eine, wenn auch geringe Weiterleitung beob-

achten. Eine verbesserte Aufnahme des Antibiotikums durch die Blätter sollte sich durch eine geeignete Formulierung (Aufbereitung von Wirkstoffen zu einer anwendungsfähigen Form) erreichen lassen.

Sollte Nikkomycin als Systemikum selektive fungizide Wirkung in Pflanzen entfalten können, wären die damit verbundenen Vorteile offenbar. Es könnte nicht nur als protektives, sondern auch als kuratives Fungizid eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil bestünde darin, daß es in der Pflanze auch neu zuwachsende Organe schützen würde.
Es gibt jedoch auch Nachteile systemischer Wirkstoffe, die ihre Einsatzmöglichkeit begrenzen. Einmal stellt oft ihre unzureichende Stabilität im Boden ein Problem dar, andererseits ist häufig ihr chemotherapeutischer Index (d.h. das Verhältnis zwischen fungizid wirksamer und für die Wirtspflanze sicher verträglicher Konzentration) nicht ausreichend sicher (Grewe, 1970).
Nicht nur die Stabilität eines Fungizids im Boden, sondern auch in den Pflanzen wirft Probleme auf. Während man auf der einen Seite wünscht, daß der Wirkstoff möglichst schnell in der Pflanze abgebaut wird, um keine Rückstandsprobleme mit den Erntegütern zu haben, soll er auf der anderen Seite jedoch so stabil sein, daß er eine nötig lange Wirkungsdauer gegenüber einem Schädling entfalten kann. Um zu einem Mittelweg zu kommen, muß man deshalb die Interessen des Erzeugers - als Anwender der Wirkstoffe - und des Verbrauchers der Erntegüter aufeinander abstimmen (Bartels, 1970).

Wie die Versuche zur Verteilung des Antibiotikums in der Pflanze gezeigt haben, nimmt die antibiotische Aktivität des aufgenommenen Nikkomycins in der Pflanze rasch ab.
Eine Inaktivierung des Antibiotikums durch Komplexbildung mit Metallen und eine Antagonisierung durch Komponenten

des Pflanzensaftes können ausgeschlossen werden; ebenso die Ausscheidung in aktiver Form durch die Pflanze. Dagegen wäre die Metabolisierung Nikkomycins zu antibiotisch unwirksamen Verbindungen denkbar. Frehse (1970) teilt die biochemischen Reaktionen,die bei einer solchen Metabolisierung vorkommen,folgendermaßen ein: I. Nicht-Synthese-Reaktionen (Oxydation, Reduktion, Hydrolyse), die zur Inaktivierung führen. II. Synthese-Reaktionen (Biosynthese aus Wirkstoff und einem endogenen Metaboliten), die zur Entgiftung führen.

Die Versuche dieser Arbeit haben zu einigen Ergebnissen über die Zwei-Komponenten-Systeme: Antibiotikum-Pilz und Antibiotikum-Pflanze geführt. Die Informationen hieraus sollen an anderer Stelle mit dem Drei-Komponenten-System: Antibiotikum-Pilz-Pflanze erweitert werden. Infektionsversuche sind in Vorbereitung, bei denen der Einfluß Nikkomycins auf folgende phytopathogene Pilze in den angeführten Wirtspflanzen (in Klammern) geprüft werden soll: Piricularia oryzae (Reis), Pellicularia sasaki (Reis) Erysiphe cichoracearum (Gurke), Puccinia recondita (Weizen), Erysiphe graminis (Gerste), Verticillium alboatrum (Tomate).

Im Pflanzenschutz werden heute (besonders in Japan) die Antibiotika Griseofulvin, Blasticidin, Kasugamycin sowie einige Polyoxine eingesetzt (Woodcock, 1973). Neuerdings findet auch Validamycin A Anwendung (Iwasa et al., 1971). Die geplanten Versuche sollen klären, ob Nikkomycin diese Liste ergänzen kann.

V ZUSAMMENFASSUNG

Streptomyces tendae (TÜ 901) produziert ein hydrophiles, amphoteres Antibiotikum. Es erhielt den Namen Nikkomycin. Außer der Hemmung des Wachstums verursacht das Antibiotikum bei einigen phytopathogenen Pilzen die Ausbildung protoplastenähnlicher Strukturen an den Hyphenspitzen.

Nikkomycin wurde durch Adsorption an Aktivkohle, anschliessende Elution sowie Chromatographie an Dowex WX 4 und Bio-Gel P 2 gereinigt.

Das Antibiotikum (0,5 µg/ml) hemmt folgende Makromolekülsynthesen in vivo bei Mucor hiemalis (+): Chitinsynthese 80%, RNS-Synthese 60%, Proteinsynthese 40%.

Versuche zur Chitinsynthese in vitro ergaben, daß Nikkomycin (0,25 µg/ml) eine partikuläre Chitinsynthetase aus Mucor hiemalis (+) kompetitiv zu UDP-GlcNAc hemmt.

Nikkomycin kann als Systemikum Tomatenpflanzen durch die Wurzeln zugeführt und über die Wasserleitungsbahnen in ihnen verteilt werden; seine Aufnahme durch die Blätter ist nur gering, ebenso die Weiterleitung in ihnen. Für die getesteten Pflanzen war Nikkomycin nicht, oder nur wenig toxisch.

Für Nikkomycin wurde die Summenformel $C_{16}H_{20}N_4O_8$ gefunden. Ein Teilstück des Antibiotikums hat die Formel $C_{10}H_{14}N_2O_4$. Nikkomycin wurde mit ähnlichen Antibiotika verglichen; da in jedem Fall eine Identität ausgeschlossen werden konnte, ist es als neues Antibiotikum anzusehen.

VI LITERATURVERZEICHNIS

Bartels, W.: Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel. In: Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Bd. 1, 16-40. Hrsg. R. Wegler. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York (1970)

Bartnicki-Garcia, S. and W. J. Nickerson: Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of Mucor rouxii. Biochim. Biophys. Acta 58, 102-119 (1962)

Bartnicki-Garcia, S. and E. Lippman: Inhibition of Mucor rouxii by polyoxin D: Effects on chitin synthetase and morphological development. J. Gen. Microbiol. 71, 301-307 (1972)

Betina, V., M. Betinova, and M. Kutkova: Effect of cyanein on growth and morphology of pathogenic fungi. Arch. Mikrobiol. 55, 1-16 (1966)

Betz, A.: Enzyme. Gewinnung, Analyse, Regulation. Verlag Chemie: Weinheim (1974)

Camargo, E. P., C. P. Dietrich, D. Sonneborn, and J. L. Strominger: Biosynthesis of chitin in spores and growing cells of Blastocladiella emersonii. J. Biol. Chem. 242, 3121-3128 (1967)

Corbaz, R., L. Ettlinger, W. Keller-Schierlein und H. Zähner: Zur Systematik der Actinomyceten. 1. Über Streptomyceten mit rhodomycinartigen Pigmenten.
Arch. Mikrobiol. 25, 325-332 (1957)

deKloet, S. R.: Ribonucleic acid synthesis in yeast. The effect of cycloheximid on the synthesis of ribonucleic acid in Saccharomyces carlsbergensis.
Biochem. J. 99, 566-581 (1966)

Endo, A. and T. Misato: Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine:chitin N-acetylglucosaminyltransferase in Neurospora crassa.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 718-722 (1969)

Endo, A., K. Kakiki, and T. Misato: Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D.
J. Bact. 104, 189-196 (1970)

Frehse, H.: Rückstände von Pflanzenschutzmitteln in Nahrung und Umwelt. Analytische, toxikologische und gesetzliche Fragen. In: Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel.
Bd. 2, 433-515. Hrsg. R. Wegler. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York (1970)

Fuller, M. S. and I. Barshad: Chitin and cellulose in the cell walls of Rhizidiomyces sp.
Amer. J. Bot. 47, 105-109 (1960)

Gäumann, E. und O. Jaag: Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I.
Ber. Schweiz. Bot. Ges. 57, 5-36 (1947)

Gale, G. R.: Effects of the antifungal peptide Ro-27758 on morphology of Mucor corymbifera. J. Bact. 85, 833-837 (1963)

Glaser, L. and D. H. Brown: The enzymatic synthesis in vitro of hyaluronic acid chains. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 41, 253-260 (1955)

Glaser, L. and D. H. Brown: The synthesis of chitin in cell-free extracts of Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 228, 729-742 (1957)

Gottlieb, D., H. E. Carter, Lung-chi Wu, and J. H. Sloneker: Inhibition of fungi by filipin and its antagonism by sterols. Phytopathology 50, 594-603 (1960)

Gottlieb, D.: Biosynthetic processes in germinating spores. In: The fungus spore. pp 217-233 Ed. M. F. Madelin. Butterworths: London (1966)

Gray, R. A.: The downward translocation of antibiotics in plants. Phytopathology 48, 71-78 (1958)

Grewe, F.: Wesen, Einteilung, Prüfungsmethoden und Geschichte der Fungizide. In: Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel. Bd. 2, 3-43. Hrsg. R. Wegler. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1970)

Hagenmaier, H.: Persönliche Mitteilung. Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität Tübingen (1974)

Hashimoto, T., M. Kito, T. Takeuchi, M. Hamada, K. Maeda, Y. Okami, and H. Umezawa:
Ablastmycin, a new anti-piricularia antibiotic.
J. Antib. A 21, 37-43 (1968)

Hoagland, D. R. and W. C. Snyder: Nutrition of strawberry plant under controlled conditions.
Amer. Soc. Hortic. Sci. 30, 288-293 (1933)

Höhne, H.: Die Reinigung und Charakterisierung eines wasserlöslichen, antifungischen Antibiotikums aus Streptomyces tendae. Diplomarbeit Universität Tübingen (1972)

Hori, M., K. Kakiki, S. Suzuki, and T. Misato: Studies on the mode of action of polyoxins. Part III. Relation of polyoxin structure to chitin synthetase inhibition.
Agr. Biol. Chem. 35, 1280-1291 (1971)

Hori, M., K. Kakiki, and T. Misato: Further study on the relation of polyoxin structure to chitin synthetase inhibition.
Agr. Biol. Chem. 38, 691-698 (1974 a)

Hori, M., K. Kakiki, and T. Misato: Interaction between polyoxin and active center of chitin synthetase.
Agr. Biol. Chem. 38, 699-705 (1974 b)

Hütter, R., W. Keller-Schierlein, J. Nüesch und H. Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen.
48. Mitt. Scopamycine
Arch. Mikrobiol. 51, 1-8 (1965)

Hütter, R., K. Poralla, H. G. Zachau und H. Zähner:
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen.
51. Mitt. Über die Wirkungsweise von Borrelidin - Hemmung des Threonineinbaus in sRNS.
Biochem. Z. 344, 190-196 (1966)

Hütter, R.: Systematik der Streptomyceten.
Karger: Basel, New York (1967)

Isono, K., J. Nagatsu, Y. Kawashima, and S. Suzuki:
Studies on polyoxins, antifungal antibiotics.
Part I.
Agr. Biol. Chem. 29, 848-854 (1965)

Isono, K., J. Nagatsu, K. Kobinata, K. Sasaki, and S. Suzuki: Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part V.
Agr. Biol Chem. 31, 190-199 (1967)

Isono, K., K. Kobinata, and S. Suzuki: Isolation and characterization of polyoxins J, K and L.
New components of polyoxin complex.
Agr. Biol. Chem. 32, 792-793 (1968)

Isono, K., S. Suzuki, and T. Azuma: Semisynthetic polyoxins.
Aminoacyl derivatives of polyoxin C and their in vitro activity.
Agr. Biol. Chem. 35, 1986-1989 (1971)

Isono, K., P. F. Crain, T. J. Odiorne, J. A. McCloskey, and J. Suhadolnik: Biosynthesis of the 5-fluor-polyoxins, aberrant nucleoside antibiotics.
J. Amer. Chem. Soc. 95, 5788-5789 (1973)

Iwasa, T., E. Higashide, H. Yamamoto, and M. Shibata: Studies on validamycins, new antibiotics. II. Production and biological properties of validamycins A and B. J. Antib. A 24, 107-113 (1971)

Jan, Y. N.: Properties and cellular localization of chitin synthetase in Phycomyces blakesleeanus. J. Biol. Chem. 249, 1973-1979 (1974)

Jaworski, E. G., Li C. Wang, and W.D. Carpenter: Biosynthesis of chitin in cell-free extracts of Venturia inaequalis. Phytopathology 55, 1309-1312 (1965)

Keller, F. A. and E. Cabib: Chitin and yeast budding. Properties of chitin synthetase from Saccharomyces carlsbergensis. J. Biol. Chem. 246, 160-166 (1971)

Kirst, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis. Dissertation Universität Tübingen (1971)

Kneifel, H., W. A. König, G. Wolf, and H. Zähner: Metabolic products of microorganisms 123. Thraustomycin, a new antifungal nucleoside antibiotic from Streptomyces exfoliatus. J. Antib. A 27, 20-27 (1974)

Leloir, L.F. and C. E. Cardini: The biosynthesis of glucosamin. Biochim. Biophys. Acta 12, 15-22 (1953)

Lineweaver, H. and D. Burk: The determination of enzyme dissociation constants.
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

Links, J., J. E. Rombouts, P. Keulen: The "bulging factor", a fungistatic antibiotic produced by a streptomyces strain, with evidence of an active water-excreting mechanism in fungi.
J. Gen. Microbiol. 17, 596-600 (1957)

Luke, H. H. and H. E. Wheeler: Toxin production by Helminthosporium victoriae.
Phytopathology 45, 453-458 (1955)

Mahl, D.: Ropalocidin, ein antifungisches Antibiotikum aus Streptomyces violaceoniger.
Dissertation Universität Tübingen (1971)

McMurrough, I., A. Flores-Carreon, and S. Bartnicki-Garcia: Pathway of chitin synthesis and cellular localization of chitin synthetase in Mucor rouxii.
J. Biol. Chem. 246, 3999-4007 (1971)

McMurrough, I. and S. Bartnicki-Garcia: Properties of a particulate chitin synthetase from Mucor rouxii.
J. Biol. Chem. 246, 4008-4016 (1971)

Merkenschlager, M., K. Schlossmann und W. Kurz: Ein mechanischer Zellhomogenisator und seine Anwendbarkeit auf biologische Probleme.
Biochem. Z. 329, 332-340 (1957)

Miller, R. W.: Allosteric inhibitors.
In: Metabolic inhibitors. A comprehensive treatise. Vol. IV, 1-44. Ed.: Hochster, R. M., M. Kates, and J. H. Quastel.
Academic Press: New York, London (1973)

Mizuno, M., Y. Shimojima, T. Sugawara, and I. Takeda:
An antibiotic 24010.
J. Antib. A 24, 896-899 (1971)

Müller, A.: Siderochrome aus Mikroorganismen.
Dissertation Universität Tübingen (1968)

Nishi, A.: Role of polyphosphate and phospholipid in germinating spores of Aspergillus niger.
J. Bacteriol. 81, 10-19 (1961)

Orengo, A.: Regulation of enzymatic activity by metabolites. I. Uridine-cytidine kinase of Novikoff ascites rat tumor.
J. Biol. Chem. 244, 2204-2209 (1969)

Poralla, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolidantibiotika.
Dissertation Universität Tübingen (1967)

Porter, C. A. and E. G. Jaworski: Biosynthesis of chitin during various stages in the metamorphosis of Prodenia eridania.
J. Insect Physiol. 11, 1151-1160 (1965)

Pramer, D.: The movement of chloramphenicol and streptomycin in broad bean and tomato plants. Ann. Bot. N.S. 18, 463-470 (1954)

Pringle, R. B. and A. C. Braun: The isolation of the toxin of Helminthosporium victoriae. Phytopathology 47, 369-371 (1957)

Reissig, J.: Phosphoacetylglucosamine mutase of Neurospora J. Biol. Chem. 219, 753-767 (1956)

Ruffner, F.: Physiologische Studien an Pisum sativum und Solanum lycopersicum im Zusammenhang mit der Entgiftung von Fusarinsäure. Dissertation ETH Zürich (1974)

Sasaki, S., N. Ohta, I. Yamaguchi, S. Kuroda, and T. Misato: Studies on polyoxin action. Effect on respiration and synthesis of protein, nucleic acids and cell-wall of fungi. J. Agr. Chem. Soc. Jap. 42, 633-638 (1968)

Scheffer, R. P. and A. J. Ullstrap: A host-specific toxic metabolite from Helminthosporium carbonum. Phytopathology 55, 1037-1038 (1965)

Shoji, J., R. Sakazaki, M. Mayama, Y. Kawamura, and Y. Yasuda: A new antibiotic, bulgerin, active against phytopathogenic fungi. J. Antib. A 23, 295-299 (1970)

Siddhikol, C., J. W. Erbstoeszer, and B. Weisblum:
Mode of action of streptolydigin.
J. Bacteriol. 99, 151-155 (1969)

Siegel, M. R. and H. D. Sisler: Site of action of cycloheximide in cells of Saccharomyces pastorianus.
I. Effect of the antibiotic on cellular metabolism.
Biochim. Biophys. Acta 87, 70-82 (1964 a)

Siegel, M. R. and H. D. Sisler: Site of action of cycloheximide in cells of Saccharomyces pastorianus.
II. The nature of inhibition of protein synthesis in a cell-free system.
Biochim. Biophys. Acta 87, 83-89 (1964 b)

Störl, K. und Venner: Einbau von Thymin und Thymidin in die DNS von Proteus mirabilis.
Z. Allg. Mikrobiol. 12, 479-486 (1972)

Sussman, A. S.: Dormancy and spore germination.
In: The fungi. An advanced treatise. Vol. II, 733-764. Ed.: Ainsworth, G. C. and A. S. Sussman.
Academic Press: New York, London (1966)

Wolf, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30S-Untereinheit.
Dissertation Universität Tübingen (1971)

Woodcock, D.: Structure-activity relationship. In: Systemic fungicides. pp 34-85. Ed.: R. W. Marsh
Longman Group Ltd.: London (1973)

Lebenslauf

Helmut Höhne

Geboren am 15. September 1944 in Halle/Saale

Staatsangehörigkeit: deutsch

Volksschule von 1951 bis 1955

Gymnasium von 1955 bis 1965; Abitur am Leibniz-Gymnasium, Stuttgart-Feuerbach, März 1965

Psychologiestudium von 1965 bis 1967 in Tübingen

Biologiestudium ab 1967 in Tübingen (WS 1969/70 in München)

Vorprüfung 15. April 1969

Diplomprüfung 3. Juli 1972

anschließend Anfertigung der Dissertation "Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der mikrobiellen Chitinsynthese" am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, unter Anleitung von Professor Dr. H. Zähner.

Meine akademischen Lehrer:

D. Ammermann, E. Bayer, R. Bergius, G. Boche, K. Brecht,
E. Bünning, H. Diekmann, W. Gieseler, H. Göppinger,
A. Gottschalk, J. Guglielmi, H. Günzl, E. Höhn, K. Hofmeier,
R. Huisgen, R. Kienzle, H. Kneifel, H. Krüger, D. Krug,
W. Löffler, H. Machleidt, K. Mägdefrau, H. Mauser, H. Meier,
H. Metzner, G. Mickoleit, E. Mittenecker, F. P. Möhres,
K. Mörike, E. Müller, H. Peters, H. Remmer, G. Richter,
A. Rieker, W. Rüdorff, R. Schaeffler, L. Scheglmann,
V. Schwartz, U. Schwarz, W. Schweizer, B. Schwemmle,
E. Stumpp, G. Weitzel, U. Weser, K. Wöhrmann, H. Zähner